

**HENRIQUE JOSÉ POLATO GOMES**

**INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE E  
SNPs DO GENE *BCHE* DA BUTIRILCOLINESTERASE E PRÓXIMOS A ESTE**

**CURITIBA  
2010**

**HENRIQUE JOSÉ POLATO GOMES**

**INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE E  
SNPs DO GENE *BCHE* DA BUTIRILCOLINESTERASE E PRÓXIMOS A ESTE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
curso de Pós-Graduação em Genética da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Eleidi Alice Chautard  
Freire Maia.

Co-orientadores: Prof. Dr. Marcelo Távora  
Mira e Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de  
Souza.

**CURITIBA  
2010**

*“- O senhor poderia me dizer qual caminho tomar para sair daqui?  
Interroga Alice.  
- Isso depende muito de para onde você quer ir. Respondeu o Gato.  
- Não me importo muito para onde... Retrucou Alice.  
- Então não importa o caminho que você escolha. Disse o gato.”  
(Lewis Carrol – Alice no País das Maravilhas)*

## AGRADECIMENTOS

A esta entidade que eu chamo de Deus, que esteve sempre comigo independente da minha teimosia e insatisfação.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão e dedicação constantes, incondicionais e inexprimíveis.

À Virgínia, que sempre foi o cais que aparecia quando a tempestade não queria passar.

À professora Eleidi A. Chautard Freire Maia, pela paciência, orientação, ensinamentos e pelos votos de confiança.

Ao professor Ricardo L. Rodrigues de Souza, pela disponibilidade e pela imensa ajuda com os programas indecifráveis.

Ao professor Marcelo Távora Mira, pelo acolhimento e confiança.

A todos os amigos e aos colegas de laboratório, que conhecem o temperamento das metodologias e as forças cósmicas sobrenaturais que não deixam as coisas funcionarem direito até que o prazo final se aproxime. Pela prestimosa ajuda sem fins lucrativos, obrigado.

A todos os grandes mestres que me levaram a fazer mestrado e buscar esse mesmo título: Mestre Yoda, Mestre dos Magos, Mestre Miyagi, Mestre Kame, Mestre Ancião, Mestre Splinter e tantos outros mestres que me ensinaram a não levar as coisas tão a sério...

## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | <b>VII</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>   | <b>IX</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>X</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                       | <b>3</b>   |
| 2.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS .....                                       | 3          |
| 2.1.1 Formas clínicas .....   | 4          |
| 2.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE.....                             | 5          |
| 2.3 LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE <i>BCHE</i> .....                       | 8          |
| 2.4 BUTIRILCOLINESTERASE: ASPECTOS GERAIS E BREVE HISTÓRICO .....           | 9          |
| 2.5 MÉTODO DE FENOTIPAGEM POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....                     | 10         |
| 2.6 VARIANTES NÃO USUAIS DO GENE <i>BCHE</i> .....                          | 11         |
| 2.6.1 Variante atípica 209A>G (p. D70G) .....                               | 14         |
| 2.6.2 Variante 208G>C (p. D70H) .....                                       | 16         |
| 2.6.3 Variante -116G>A .....  | 16         |
| 2.6.4 Variante 1615G>A (p. A539T) .....                                     | 16         |
| 2.7 RELAÇÃO ENTRE BUTIRILCOLINESTERASE E HANSENÍASE.....                    | 17         |
| 2.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE COLINESTERASES, HANSENÍASE E RESPOSTA<br>IMUNE..... | 19         |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>21</b>  |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>22</b>  |
| 4.1 MATERIAL .....  | 22         |
| 4.1.1 Amostra de hansenianos.....   | 22         |
| 4.1.2 Escolha dos controles .....   | 24         |
| 4.2 METODOLOGIA .....   | 25         |
| 4.2.1 Coleta das amostras e extração do dna .....                           | 25         |
| 4.2.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) .....                            | 25         |
| 4.2.3 PCR - SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples).....              | 26         |
| 4.2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....                          | 26         |
| 4.2.3.2 Coloração do gel .....  | 27         |
| 4.2.4 Metodologia <i>taqman</i> .....                                       | 28         |
| 4.2.5 Análise estatística dos resultados .....                              | 32         |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.5.1 <i>Odds Ratio</i> .....   | 33        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>35</b> |
| 5.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS .....   | 35        |
| 5.2. CÁLCULO DE <i>ODDS RATIO</i> .....   | 37        |
| 5.3. NÚMERO E FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GENÓTIPOS DOS SEIS SNPS<br>ESTUDADOS.....                       | 38        |
| 5.3.1 Genótipos dos seis snps apenas para os doentes heterozigotos para rs1799807<br>(D70G).....      | 42        |
| 5.4 DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE<br>LIGAÇÃO DOS SEIS SNPS ESTUDADOS..... | 43        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>59</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Variantes do gene <i>BCHE</i> .....   | 12 |
| <b>Tabela 2:</b> Distribuição dos níveis de DN entre pacientes normais e hansenianos.....  | 17 |
| <b>Tabela 3:</b> Porcentagem de inibição da butirilcolinesterase pela dibucaína (DN) entre pessoas normais e pacientes hansenianos da Etiópia.....   | 18 |
| <b>Tabela 4:</b> Número e porcentagem de pacientes por data de nascimento.....   | 22 |
| <b>Tabela 5:</b> Número e porcentagem de pacientes por data de diagnóstico.....  | 23 |
| <b>Tabela 6:</b> Número e porcentagem de pacientes por grupo étnico.....   | 23 |
| <b>Tabela 7:</b> Número e porcentagem de pacientes por cidade de origem.....   | 24 |
| <b>Tabela 8:</b> Número e porcentagem dos controles por datas de nascimento.....   | 24 |
| <b>Tabela 9:</b> Número e porcentagem de controles por grupo étnico.....   | 25 |
| <b>Tabela 10:</b> Dados de distribuição de frequência genótipica e alélica obtidos para os SNPs analisados.....  | 35 |
| <b>Tabela 11:</b> Valores de Hardy-Weinberg para os seis SNPs estudados, considerando-se os grupos: multibacilares, paucibacilares, doentes e controles.....   | 36 |
| <b>Tabela 12:</b> Valores de $\chi^2$ e p para os seis SNPs estudados, comparando-se hansenianos multibacilares com paucibacilares, e o total de doentes com os controles.....                         | 37 |
| <b>Tabela 13:</b> Números e frequências (%) dos genótipos dos controles, relativos a seis SNPs.....  | 39 |
| <b>Tabela 14:</b> Números e frequências (%) dos genótipos de hansenianos multibacilares, relativos a seis SNPs.....  | 40 |
| <b>Tabela 15:</b> Números e frequências (%) dos genótipos dos hansenianos paucibacilares, relativos a seis SNPs.....   | 41 |
| <b>Tabela 16:</b> Comparações entre controles (C) e doentes (D) em relação aos genótipos com frequência superior a 5% em pelo menos um desses grupos. Os valores de p encontram-se em porcentagem..... | 42 |
| <b>Tabela 17:</b> Genótipos dos SNPs de pacientes multibacilares (M) e paucibacilares (P) que são heterozigotos para rs1799807 ( <i>D70G</i> ).....  | 43 |
| <b>Tabela 18:</b> Distribuição de frequência dos 22 haplótipos dos seis SNPs estudados em doentes multibacilares.....  | 45 |
| <b>Tabela 19:</b> Distribuição de frequência dos haplótipos dos cinco SNPs estudados em doentes paucibacilares.....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 20:</b> Distribuição de frequência dos haplótipos dos seis SNPs estudados em todo o grupo dos doentes.....  | 46 |
| <b>Tabela 21:</b> Distribuição de frequência dos haplótipos dos seis SNPs estudados em todo o grupo dos controles.....  | 47 |
| <b>Tabela 22:</b> Comparações entre controles (C) e doentes (D) em relação aos haplótipos com frequência superior a 5% em pelo menos um desses grupos. Os valores de p encontram-se em porcentagem..... | 48 |
| <b>Tabela 23:</b> Valores referentes ao desequilíbrio de ligação no grupo de doentes entre os seis SNPs: $D'$ (%), $r^2$ (%) e, em caso de significância, p (%).....                                    | 49 |
| <b>Tabela 24:</b> Valores referentes ao desequilíbrio de ligação no grupo de controles entre os seis SNPs: $D'$ (%), $r^2$ (%) e, em caso de significância, p (%).....                                  | 50 |
| <b>Tabela 25:</b> Comparação entre os valores de $D'$ (%) e $r^2$ (%) obtidos do programa Haploview com os resultados obtidos para o desequilíbrio de ligação entre doentes (Do) e controles (C).....   | 55 |
| <b>Quadro 1:</b> Representação esquemática do cálculo de <i>odds ratio</i> .....  | 33 |



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho esquemático da estrutura do gene *BCHE*, mostrando os quatro éxons, o número de pares de bases que os compõem e variantes mutações tratadas nesse estudo, bem como suas frequências. A região em preto se refere à proteína madura.....8
- Figura 2.** Exemplo de gel para *A539T*. Os heterozigotos estão evidenciados por flechas.....27
- Figura 3:** SNPs a montante, a jusante e próprios do gene *BCHE*, com os respectivos valores de  $D'$ (%). Os losangos de cor cinza representam valor de  $D' = 1,0$ . O losango de cor cinza escura também representa um valor de  $D' = 1,0$ , mas associado a um valor alto de lod score (6,93). O SNP referente à mutação *-116A* (rs126680) não está representado na figura devido à ausência de dados disponíveis sobre seus valores de  $D'$  no HapMap.....28
- Figura 4:** Representação de uma genotipagem por PCR em tempo real.....29
- Figura 5:** Exemplo de amostra homozigota para o alelo *A* (marcado por VIC) para o SNP rs4440084.....31
- Figura 6:** Exemplo de amostra homozigota para o alelo *G* (marcado por FAM) para o SNP rs4440084. Embora haja uma leve subida da curva referente ao alelo marcado por VIC, a curva do alelo marcado por FAM atinge níveis muito superiores de fluorescência.....31
- Figura 7:** Exemplo de amostra heterozigota para a mutação *A* (70*G*) do rs1799807. As duas curvas de fluorescência, neste caso, sobem juntas e de forma aproximadamente paralela.....35

## RESUMO

A hanseníase, ou mal de Hansen, é uma doença infecciosa granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta predominantemente o sistema nervoso periférico, podendo ocasionar perda da condução neural e diversas consequências. Os fatores genéticos que determinam sua susceptibilidade não estão completamente conhecidos. A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima sérica, codificada pelo gene *BCHE*, relacionada ao metabolismo de lípidos e à proteção da acetilcolinesterase. Estudos sobre uma das variantes do gene *BCHE*, a atípica ou *D70G* (rs1799807), foram controversos quanto à associação ao mal de Hansen. O objetivo deste estudo foi verificar as frequências de variantes do rs1799807 e de mais cinco polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), sendo dois internos, rs1126680 (*G-116A*) e rs1803274 (*A539T*), dois a montante (rs2863381 e rs4440084) e um a jusante (rs4387996) do gene *BCHE*, visando investigar a possível associação com o mal de Hansen *per se* ou com suas formas clínicas. Foram estudados 167 pacientes (116 multibacilares e 51 paucibacilares) e 150 controles normais, genotipados pela técnica de PCR em tempo real (*Taqman*). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre doentes e controles quanto às distribuições genotípica e alélica do SNP rs1799807, com as seguintes frequências:  $7,88 \pm 2,10\%$  heterozigotos e  $3,94 \pm 1,01\%$  do alelo *70G* em doentes;  $1,33 \pm 0,94\%$  heterozigotos e  $0,67 \pm 0,57\%$  do alelo *70G* nos controles. O valor de *odds ratio* (OR) foi 6,33 com IC<sub>(95%)</sub> de 1,40 a 28,53, significando que o heterozigoto possui uma chance cerca de seis vezes maior de adquirir a hanseníase. Não houve diferenças significativas na frequência de *70G* e de *70DG* entre pacientes pauci e multibacilares. Foi encontrada frequência significativamente menor em pacientes quanto ao haplótipo [*T*; *C*; *G*; *A*; *G*; *A*] ( $p = 2,31\%$ , após correção de Bonferroni), com valor de OR de 0,34 (IC<sub>(95%)</sub> de 0,16 a 0,72), relacionado a um efeito protetor, em relação à hanseníase, cerca de 3 vezes maior do que os demais haplótipos. Se os dados referentes à variante atípica (*70G*) não estiverem indicando a presença de uma outra variante causal, devido a desequilíbrio de ligação, é possível que essa variante da BChE possa predispor à hanseníase, pelo fato de poder influenciar na resposta imune regulada pela acetilcolina.

## ABSTRACT

Leprosy is a granulomatous chronic infectious disease, caused by *Mycobacterium leprae*, affecting predominantly the peripheral nervous system, leading to loss of neural flux and many related consequences. The genetic factors that play a role on the susceptibility of the disease are not completely known. Butyrylcholinesterase (BChE) is a serum enzyme coded by the *BCHE* gene, related to lipid metabolism and protection of acetylcholinesterase. Studies on one of the *BCHE* variants, called atypical or *D70G* (rs1799807), were controversial on what refers to its association to leprosy. Therefore, the aim of the present study was to estimate the frequencies of variants of rs1799807, plus five other single nucleotide polymorphisms (SNPs), two inside the gene region rs1126680 (*G-116A*) and rs1803274 (*A539T*), two upstream (rs2863381 and rs4440084) and one downstream (rs4387996) of the *BCHE* gene, aiming to investigate possible association with leprosy *per se* or with its clinical manifestations. A total of 167 patients (116 multibacillary and 51 paucibacillary) and 150 healthy controls were genotyped by RT-PCR (Taqman). Significant statistical difference was found between patients and controls for genotype and allele distributions of the SNP rs1799807, showing  $7.88 \pm 2.10\%$  heterozygotes and  $3.94 \pm 1.01\%$  of the *70G* allele in patients;  $1.33 \pm 0.94\%$  heterozygotes and  $0.67 \pm 0.57\%$  of the *70G* allele in controls. Odds ratio (OR) was 6.33 (IC<sub>95%</sub> from 1.40 to 28.53), meaning that the heterozygote has a 6.33 times more chance to acquire leprosy. There was not statistical significant difference between pauci and multibacillary patients on the *70G* and *70DG* frequencies. Significantly higher frequency ( $p = 2.31\%$ , after Bonferroni's correction) of the [T; C; G; A; G; A] haplotype was found in controls with OR = 0.34 (IC<sub>95%</sub> from 0.16 to 0.72), related to a protective effect 3 times more than the other haplotypes. If the present data referring to the atypical variant (*70G*) are not indicating some other causal genetic variant due to linkage disequilibrium, it is possible that the atypical variant of BChE may predispose to leprosy by influencing the acetylcholine mediated immune response.

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa e crônica causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* e, embora existam relatos muito antigos e muitos avanços em seu tratamento, ainda é um grave problema de saúde pública, uma vez que afeta um grande número de pessoas no Brasil e no resto do mundo. No ano de 2008, foram detectados 249.007 novos casos em 121 países e, no início de 2009, registrada uma prevalência de 213.036 casos na população mundial (WHO, 2009).

O desenvolvimento da doença depende da exposição ao agente etiológico e da reação do hospedeiro contra este. Estudos familiares, que documentaram a recorrência da doença, indicaram que fatores genéticos estariam influenciando o tipo de resposta apresentada. Nos indivíduos que adoecem, o espectro de manifestações clínicas pode ser bastante variável. Uma das classificações da doença, estabelecida com finalidade terapêutica, foi proposta pela Organização Mundial de Saúde - OMS e considera duas formas polares (WHO, 1982): hanseníase paucibacilar, que se caracteriza por poucas lesões de pele bem definidas e ausência de *M. leprae* histologicamente detectável nestas lesões; e hanseníase multibacilar que é caracterizada pelo alto número de lesões, as quais contêm bacilos detectáveis. A hanseníase paucibacilar inclui as formas indeterminada (I) e tuberculóide (T) da classificação de Madrid (WHO, 1980), e as formas indeterminada (I), tuberculóide-tuberculóide (TT) e *borderline*-tuberculóide (BT) da classificação de RIDLEY E JOPLING (1966). A hanseníase multibacilar inclui as formas lepromatosa (L) e *borderline* (B) da classificação de Madrid (WHO, 1980), e as formas lepromatosa-lepromatosa (LL), *borderline*-lepromatosa (BL) e *borderline*-*borderline* (BB) da classificação de RIDLEY E JOPLING (1966).

Variantes de alguns genes como *VDR* (ROY e cols., 1999), *NRAMP1* (ABEL e cols., 1998; ALCAÏS e cols., 2000), *TLR2* (KANG e CHAE, 2001), *TNFA* (SHAW e cols., 2001) *PARK2* e *PACRG* (MIRA e cols., 2003, 2004), e de diversos genes *HLA* (VISENTAINER e cols., 1997; revisão em FITNESS e cols., 2002) já foram associadas à hanseníase, mas ainda falta um melhor esclarecimento do controle genético da doença. Os estudos já realizados sustentam que ele pode ocorrer em duas situações, na susceptibilidade à hanseníase *per se* e na manifestação das diferentes formas clínicas.

O gene candidato do presente estudo é o gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), que codifica a enzima butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), também referida como BChE, uma enzima sérica produzida principalmente no fígado. A BChE é uma esterase que hidrolisa inúmeros ésteres de

colina, bem como outros ésteres. Entretanto, seu substrato natural ainda não foi elucidado. Há hipóteses que relacionam a BChE ao metabolismo de lípidos (KUTTY, 1980), à proteção da acetilcolinesterase e à desintoxicação de xenobióticos (DUYSEN e cols., 2007).

Observando que indivíduos com a variante atípica (70G) da BChE apresentavam uma apnéia prolongada, após utilização do relaxante muscular succinilcolina, e que hansenianos também apresentavam esta forma de apnéia após o uso desse relaxante muscular, sugeriu-se associação entre esta variante da BChE e a hanseníase (VARKEY, 1968, observações não publicadas; *apud* THOMAS e cols., 1976). Por isso, nessa época foram feitos estudos com o intuito de comparar os níveis da atividade da BChE em indivíduos saudáveis e em doentes, tentando esclarecer possíveis fatores genéticos da hanseníase (THOMAS e JOB, 1972).

Nesses estudos, a fenotipagem foi realizada por metodologia de inibição enzimática, e resultados conflitantes foram encontrados, sendo que alguns trabalhos (THOMAS e cols., 1976) encontraram diferenças estatisticamente significativas nas frequências de fenótipos entre os doentes e seus controles, enquanto que outros trabalhos com metodologia semelhante não mostraram o mesmo resultado (WHITTAKER e cols., 1976).

O confronto desses dados gerou dúvidas quanto à existência de uma relação entre a BChE e a hanseníase. A discordância dos resultados poderia estar relacionada à metodologia utilizada para a fenotipagem, pois fatores como a medicação utilizada e/ou danos nas células hepáticas poderiam levar a um decréscimo nos níveis da enzima e influenciar o resultado da fenotipagem. GOMES (2007) e GOMES e cols. (2008) genotiparam, por análise de DNA, uma amostra de 86 hansenianos e 86 controles para o segmento do exon 2 do gene *BCHE*, onde se localiza a variante atípica da butirilcolinesterase e mostraram que os doentes apresentaram uma frequência estatisticamente maior de heterozigotos para a variante atípica, quando comparados aos controles. Isto mostrou uma forma de associação entre a doença e a variante, mas não foi possível atribuir a relação fisiológica simplesmente à variante 70G, pois outras variantes deste gene, em desequilíbrio com 70G, ou mesmo SNPs próximos, podem ser responsáveis por essa associação.

Assim, o propósito desse estudo foi ampliar a amostra estudada por GOMES e cols. (2008) e comparar as frequências de variantes do gene *BCHE* e de SNPs próximos entre pacientes hansenianos e controles saudáveis, por análise do DNA, visando esclarecer a possível associação entre susceptibilidade ao mal de Hansen e a variante atípica do gene *BCHE*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HANSENÍASE: ASPECTOS GERAIS

A hanseníase, ou mal de Hansen (anteriormente conhecida por lepra), é uma doença bacteriana infecciosa e de evolução lenta e crônica. É causada pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae* e afeta principalmente o sistema nervoso periférico, mucosas e pele, podendo ocasionar lesões nos nervos e uma perda significativa da condução neural.

O comprometimento dos nervos (neurites) pode levar à paralisia de músculos e gerar deformidades como o pé eqüino e o pé eqüino-varo (MAGALHÃES E DUERKSEN, 2001), “mão em garras” (ELUI e cols., 2001) e inúmeras outras lesões cutâneas decorrentes de anestesia ou hipostesia local e de lesões recorrentes devido à falta ou diminuição da sensibilidade (BENNET e PLUM, 1997).

Todos estes fatores causados pela doença podem ser limitantes ou mesmo incapacitantes, mas são principalmente estigmatizantes. Historicamente, poucas doenças causaram um estigma social tão grande quanto o mal de Hansen. A hanseníase afeta mundialmente aproximadamente 600.000 novos indivíduos por ano (WHO, 2005). A origem desses novos casos não está bem esclarecida, pois não se conhece reservatório biológico para o *M. leprae*, que seja de importância. Por muito tempo, a doença permaneceu considerada como mutilante e incurável, mas com os tratamentos atuais já é considerada como passível de cura. O diagnóstico é realizado com base em sinais clínicos e sintomas, essencialmente baseado nas características das lesões de pele (WHO, 2005) e o tratamento preconizado pela OMS se constitui de uma combinação de clofazimina, dapsona e rifampicina, sendo gratuito no Brasil e 100% eficaz quanto à cura da doença.

As respostas à doença são idiossincráticas e dependem fundamentalmente da capacidade de mobilizar uma resposta imune contra o agente e seus antígenos. Possivelmente pela relativamente baixa patogenicidade do bacilo e pela resistência individual, nem todos os indivíduos expostos a ele contraem a hanseníase, mas nos que adoecem, a infecção evolui de diferentes formas de acordo com suas respostas imunológicas particulares (SOUZA, 1997), tanto para a doença *per se*, quanto para suas diferentes formas clínicas.

Segundo dados da OMS, as Américas têm mostrado a maior prevalência da doença (0,76/10.000 habitantes em 2007) e o segundo lugar na detecção de novos casos (5,58 /100.000 habitantes em 2006) ficando atrás apenas da região do sudeste da Ásia (WHO, 2005). O Brasil, embora comece a mostrar um declínio na taxa de novos casos, ainda apresenta uma alta

prevalência da doença, ficando apenas atrás da Índia e de algumas regiões da África (WHO, 2005). Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde, o Paraná mostrou prevalência de 0,74/10.000 habitantes e 701 casos novos, no primeiro semestre de 2006, sendo considerado, portanto, um estado hiperendêmico (SAÚDE, 2007).

### 2.1.1 Formas Clínicas

O diagnóstico da hanseníase se dá fundamentalmente pela análise de alguns sinais, como: lesões cutâneas decorrentes de ferimentos reincidentes – cuja ocorrência é favorecida pela anestesia característica da doença –, espessamento de nervos periféricos e detecção do *M. leprae* em esfregaço de linfa ou de cortes histológicos (SOUZA, 1997).

Entretanto, sua manifestação clínica é bastante heterogênea. O critério clássico de classificação das formas clínicas da doença é o proposto por RIDLEY e JOPLING (1966), que analisa aspectos clínicos e bacteriológicos da doença, mas também enfatiza seus aspectos imunológicos e patológicos. Assim, o paciente afetado pode apresentar um espectro de manifestações que varia entre as formas polares tuberculóide-tuberculóide (TT), que é mais branda e localizada, e lepromatosa-lepromatosa (LL), sistêmica e mais severa. As formas tuberculóide e lepromatosa da doença correspondem, aproximadamente, aos tipos de hanseníase paucibacilar e multibacilar, respectivamente, propostos, pela OMS (WHO, 1982), em classificação elaborada com fins terapêuticos.

De maneira geral, a interação entre o sistema imune e o *M. leprae* é mediada por receptores celulares que reconhecem padrões moleculares dos invasores. No caso de micobactérias, foram identificados os receptores *toll like* TLR1-TLR2 (na forma de heterodímero), TLR2 e TLR4 (homodímeros). A ativação através desses receptores é fundamental para o início de uma resposta imune, pois está relacionada com a secreção de interleucinas, diferenciação de macrófagos e de células dendríticas (MENDONÇA e cols. 2008).

A hanseníase tuberculóide caracteriza-se por poucas lesões bem definidas de pele e raramente detectam-se bacilos em biópsia de pele e nervos. Neste caso, os receptores mediam o reconhecimento do *M. leprae*, iniciando a via de ativação com forte resposta imunológica celular anti-*M. leprae*, do tipo Th1, de maneira que são produzidas citocinas de tipo 1, como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  (ALCAÏS e cols. 2005), estimulando a formação de clones celulares e a ativação de células NK (*natural killers*) e de macrófagos, promovendo forte atividade fagocítica, a formação de granulomas e uma melhor defesa contra a doença. Nesta situação, os receptores *toll like* 1 (TLR1) e 2 (TLR2), que estão na membrana das células de

Schwann, mediam o reconhecimento do *M. leprae*, levando à ativação de genes para apoptose e acelerando o dano nos nervos dos indivíduos que adoecem. Isto é mais comum em pacientes paucibacilares, mas pode ocorrer em pacientes multibacilares. As células de Schwann também podem ser invadidas pelo *M. leprae* através dos receptores de laminina alfa-2, o que pode estar relacionado à desmielinização em hansenianos (EMEDICINE, 2008).

Por sua vez, pacientes com hanseníase lepromatosa comumente apresentam numerosas lesões de pele inicialmente mal definidas, há detecção abundante de bacilos e anergia a antígenos do *M. leprae* (RIDLEY e JOPLING, 1966), ocorrendo reação do tipo Th2 e, conseqüentemente, produção de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10, que levam, entre outras reações, à diminuição da expressão de TLR2 em monócitos (MENDONÇA e cols., 2008) e à supressão da resposta macrofágica, o que aumenta as chances de disseminação da doença (FOSS, 1997). Além disso, em pacientes que desenvolvem essa forma clínica, já foi descrita uma mutação nos receptores TLR2 que leva a uma falha da ativação do fator de transcrição NF-kB, o que diminui a produção de citocinas inflamatórias e aumenta a produção de algumas citocinas do tipo 2, como IL-10 (KANG e CHAE, 2001). Estes autores descreveram que, no estudo em questão, 22% dos pacientes com a forma lepromatosa apresentaram esta mutação, mas ela não foi encontrada em nenhum dos pacientes com a forma tuberculoide.

## 2.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE

O mal de Hansen é uma doença granulomatosa e de longa cronicidade, e embora se reconheça a relativa baixa infectividade da doença, pouco se sabe sobre os fatores que potencialmente influenciariam a sua susceptibilidade. Há muito tempo se supunha que a hanseníase era influenciada por fatores genéticos. Entretanto, os primeiros estudos só começaram após registros do mal de Hansen em irmãos gêmeos. CHAKRAVARTTI e VOGEL (1973; *apud* MIRA, 2006) realizaram um grande estudo com gêmeos indianos, que indicou a participação de fatores genéticos tanto na susceptibilidade à doença propriamente dita, quanto às diferentes formas clínicas.

A baixa taxa de diversidade genômica entre isolados de *M. leprae* também sugere que a determinação clínica da doença se deva mais à constituição genética do hospedeiro do que aos fatores bacterianos. Entretanto, como não há um modelo animal relevante para o estudo da doença, que permita o estudo do efeito de manipulação gênica (genética reversa), a genética clássica (*forward genetics*) é a maneira utilizada na procura por genes que possam estar



relacionados aos fenótipos de susceptibilidade ou de desenvolvimento da doença (ALCAÏS e cols., 2005). Fundamentalmente, as pesquisas seguem duas estratégias. Uma delas se baseia na formulação de hipótese, com base em conhecimento prévio da doença ou de doença semelhante, que dirige a escolha de genes candidatos a serem examinados em pacientes e controles. Outra é a abordagem de extenso rastreamento genômico inicial em pacientes e controles, cuja análise propicia a formulação de uma hipótese, que será base para estudos funcionais subsequentes, como os de expressão gênica diferencial (ALCAÏS e cols. 2005). Nesses estudos podem ser usadas amostras populacionais ou de famílias, dependendo do propósito a ser alcançado.

Vários estudos foram realizados examinando a distribuição de diferentes sistemas polimórficos tanto em famílias, como em hansenianos da população geral, mas poucos foram os resultados efetivamente conclusivos. Isso, até certo ponto era esperado, visto que na maioria das investigações, a escolha dos sistemas genéticos era aleatória (BEIGUELMAN, 2002). Ainda assim, análises complexas de segregação indicam a existência de componente genético oligo ou poligênico controlando a susceptibilidade à doença, ainda que algumas dessas análises apresentem resultados divergentes quanto aos efeitos dos genes (ABEL e DEMENAI, 1988; FEITOSA e cols., 1995).

Atualmente, grande parte dos estudos procura genes candidatos, buscando explicar os fatores genéticos que influenciariam de alguma forma a infecção e o desenvolvimento do mal de Hansen, isto é, que estariam associados com a doença ou de alguma forma relacionados com os fenótipos da hanseníase.

No Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), os genes *HLA* (6q21) foram os primeiros para os quais se sugeriu associação com a hanseníase. Muitos estudos ainda estão sendo desenvolvidos tendo os genes deste complexo como candidatos, visando elucidar essa associação, enfatizando principalmente o desenvolvimento das formas clínicas da doença, que se relacionam a eles por ser diretamente dependente das respostas Th1 e Th2 (PREVEDELLO e MIRA, 2007). Dentre os genes do MHC para os quais já foi achada associação, podem-se citar: *MICA* (FITNESS e cols., 2002) e *MICB* (PREVEDELLO e MIRA, 2007), que são genes MHC de classe I, que se relacionam com a produção de polipeptídeos expressos na membrana e atuam como co-fatores para aumentar tanto a ativação de células T, como o seu reconhecimento por células NK (*natural killer*). Na região do MHC de classe II, podem-se citar os genes *HLA: DR2* (VISENTAINER e cols., 1997); *DQB1*, *DQA1* e *DRB1* que estariam interferindo na produção de interleucina 4 (SHAW e cols., 2001). Já na região do MHC de classe III, os genes produtores da linfotóxina alfa (*LTA*) e do fator de necrose tumoral (*TNFA*) são exemplos de genes já estudados. A *LTA*, substância produzida pelos linfócitos e pelas células NK, é responsável pela regulação

da resposta inflamatória. O *TNFA* condiciona a síntese da proteína TNF $\alpha$ , que está associada à ativação de macrófagos, à morte do *M. leprae* no interior da célula, à apresentação de antígenos e à modulação da produção de citocinas, que atuam no recrutamento dos leucócitos e na formação de granulomas (revisão em FITNESS e cols., 2002). Possivelmente, variantes menos funcionais desses genes de classe III levariam a uma menor ativação macrofágica e ao desenvolvimento da doença por não ocorrer a morte do *M. leprae*. A deficiência de *C4B* – componente do complemento 4B, 6p21.3 – (de MESSIAS e cols., 1993), também foi associada com eritema nodoso em pacientes com a hanseníase lepromatosa.

Associações entre hanseníase e variantes de genes, que não pertencem ao MHC, também foram detectadas: *VDR* – receptor de vitamina D, 12q13.11 (ROY e cols., 1999); *NRAMP1* atualmente denominado de *SLC11A1* – membro 1 da família 11 carreadora simporte de sódio/fosfato, 2q35 (ABEL e cols., 1998; ALCAÏS e cols., 2000); *TLR2* – *toll-like* receptor 2, 4q32 (KANG e CHAE, 2001); *TAP2* – transportador 2, *ATP-binding cassette*, 6p21.3 (RAJALINGAM e cols., 1997).

Além de estudos com genes candidatos, também foram realizados rastreamentos genômicos em regiões cromossômicas candidatas, que mostraram correlação com a doença *per se* ou com as formas clínicas. Dentre elas, podem-se citar as regiões 6p21.32 e 17q11-q21 (MILLER e cols., 2004), e a região 6q25-q27 (MIRA e cols. 2004).

O estudo feito por MIRA e cols. (2004) constou de um extenso rastreamento genômico em uma população vietnamita e identificou um novo loco relacionado com a susceptibilidade à hanseníase *per se*, localizado na região cromossômica 6q25-q27. O mesmo trabalho confirmou, na população vietnamita, a existência de um loco na região cromossômica 10p13 atuando como modificador e associado com a forma paucibacilar da doença (MIRA e cols., 2003). Esse loco já havia sido descrito em outro rastreamento genômico, realizado em uma amostra de famílias da Índia com pacientes paucibacilares (SIDDIQUI e cols., 2001), mas não havia ficado claro se a associação era com a susceptibilidade à doença propriamente dita ou se influenciaria sua forma clínica.

A construção de um mapa de desequilíbrio de ligação do segmento genômico, localizado sob o pico de escores lod, resultante de análise de ligação com dados da região cromossômica 6q25-q27, levou à identificação de um bloco de 80 kb, em desequilíbrio de ligação, contendo variantes genéticas de dois genes, *PARK2* e *PACRG*, envolvidas no controle da susceptibilidade à hanseníase *per se* na população vietnamita. O achado foi replicado e confirmado em um amplo estudo caso-controle em uma amostra populacional brasileira (MIRA e cols., 2004). Esse estudo mostrou, pela primeira vez, que pesquisas sistemáticas de associação, considerando genes

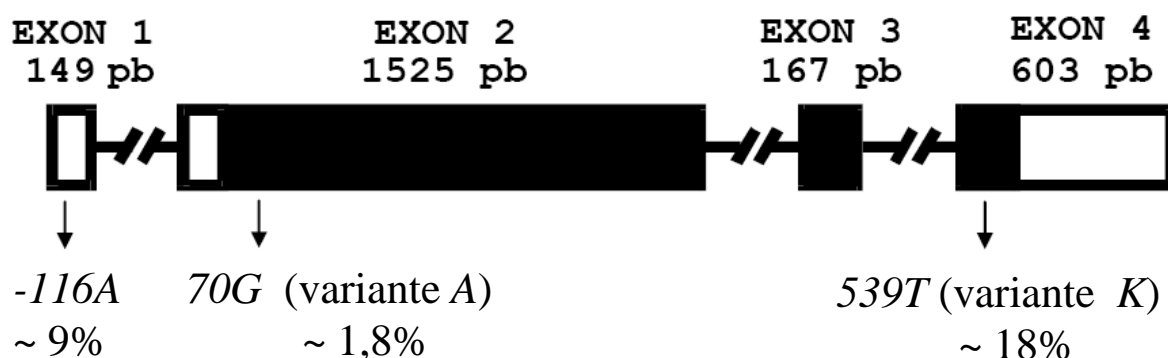
candidatos localizados em regiões previamente identificadas por rastreamentos genômicos, podem ser úteis para a descoberta de novos genes associados a doenças infecciosas (MIRA e cols., 2003, 2004).

Estes estudos sustentam a hipótese de que o controle genético da hanseníase pode ocorrer em diferentes situações, com genes influenciando susceptibilidade à hanseníase *per se* e genes influenciando sua evolução nas diferentes formas clínicas.

### 2.3 LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA DO GENE *BCHE*

O gene *BCHE* é um gene polimórfico e de cópia única que se encontra no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2). No total, apresenta 4 exons e 64.559 pares de bases considerando-se do início do exon 1 até o sitio de poliadenilação, sendo que o exon 1 é formado por 149 pb, o exon 2 por 1525 pb, o exon 3 por 167 pb e o exon 4 por 603 pb (ARPAGAUS e cols., 1990).

O promotor do gene possui um elemento iniciador rico em pirimidinas, mas não apresenta TATA ou CAAT, de modo que é expresso constitutivamente, sendo regulado apenas em fases de diferenciação do organismo. Uma representação do gene pode ser vista na figura 1.



**Figura 1.** Desenho esquemático da estrutura do gene *BCHE*, mostrando os quatro éxons, o número de pares de bases que os compõem e variantes tratadas nesse estudo, bem como suas frequências na população caucasóide de Curitiba (FURTADO-ALLE e cols., 2008; MIKAMI e cols., 2008; SOUZA e cols., 1998, respectivamente). A região em preto se refere à proteína madura.

## 2.4 BUTIRILCOLINESTERASE: ASPECTOS GERAIS E BREVE HISTÓRICO

A butirilcolinesterase (BChE), também chamada colinesterase do soro, é uma enzima sérica, produzida principalmente no fígado. Embora possua uma ampla distribuição no organismo, suas funções fisiológicas ainda não estão completamente esclarecidas.

Sabe-se que a BChE é uma esterase que pode se apresentar sob várias formas moleculares e que cerca de 70 variantes do gene *BCHE*, em geral raras, já foram descritas (revisão em SOUZA e cols., 2005). Sua capacidade de hidrolisar inúmeros ésteres de colina é bem conhecida, entretanto seu substrato natural não foi plenamente elucidado. Há hipóteses que relacionam a BChE ao metabolismo de lípidos (KUTTY, 1980) e à proteção da acetilcolinesterase, à desintoxicação de xenobióticos (DUYSEN e cols., 2007) e à condução nervosa lenta (WHITTAKER, 1980, 1986; *apud* MIKAMI 2005).

Na realidade, foi o interesse pelos agentes químicos responsáveis pela condução nervosa que possibilitou o descobrimento da butirilcolinesterase. Após a descoberta da acetilcolinesterase (AChE), responsável pela rápida degradação do neurotransmissor acetilcolina, ALLES e HAWES (1940) concluíram que a colinesterase do plasma (BChE) possui propriedades diferentes da colinesterase das hemácias (AChE), uma vez que essa hidrolisa apenas ésteres de colina, enquanto a BChE também hidrolisa uma série de ésteres não colinérgicos.

A AChE foi, e ainda é, mais estudada que a BChE, devido a sua importância na neurotransmissão colinérgica, enquanto que a BChE é fundamentalmente estudada pela sua importância no metabolismo de xenobióticos (revisão em CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007), que são substâncias químicas exógenas, ocasionalmente encontradas, mas cuja presença e produção não são esperadas no organismo. Também podem ser consideradas xenobióticos as substâncias cujas concentrações se encontram consideravelmente maiores do que as esperadas (ISCID, 2007).

O primeiro estudo, considerando um xenobiótico e a BChE, foi com a substância succinilcolina, que possui efeito semelhante ao curare, isto é, age como um relaxante muscular, sendo usada no pré-operatório, em casos de anestesia geral. Isto ocorre pelo fato da succinilcolina atuar na musculatura estriada, agindo como antagonista competitivo da acetilcolina e bloqueando seus receptores, o que impede a contração muscular (BOTGARD, 2007).

Daniel Bovet e sua equipe reconheceram as propriedades da succinilcolina, como relaxante muscular, em 1949. Além disso, também perceberam a tolerância que o organismo possui a essa droga, que se deve fundamentalmente à hidrólise da succinilcolina pela BChE. Esta

hidrólise tem como produtos a colina e o ácido succínico, ambos com baixa toxicidade; o que faz com que o efeito da succinilcolina tenha curta duração, permitindo essa tolerância por parte do organismo (BOVET, 1957; *apud* CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007).

Desta maneira, o uso da succinilcolina passou a ser indicado para casos de necessidade de um relaxante muscular de efeito curto e até mesmo em procedimentos cirúrgicos longos, variando-se a via de administração. Mas, embora uma apnéia curta de cerca de dois a seis minutos seja esperada após a ingestão de 1 mg da droga por kg do indivíduo, foram descritos casos de apnéia dita prolongada, que chegavam a durar várias horas.

Considerando-se que já havia sido mostrado que a BChE hidrolisa a succinilcolina, levantou-se a hipótese que os pacientes que apresentavam esta apnéia prolongada, isto é, que possuíam maior sensibilidade a essa droga, provavelmente apresentavam nível menor de atividade da BChE que pessoas sem essa sensibilidade. Esta hipótese foi testada por BOURNE e cols. (1952) e EVANS e cols. (1952), que encontraram menor atividade da BChE em pacientes com apnéia prolongada. FORBAT e cols. (1953; *apud* CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007), além de descreverem baixa atividade da enzima em um paciente com apnéia prolongada, também a descreveram em seu irmão, o que lhes permitiu inferir que poderia haver algum fator genético que determinasse esse decréscimo de atividade.

Entretanto, apenas os valores referentes à atividade da BChE não foram seguros o suficiente para discernir fenótipos. A classificação fenotípica só passou a ser possível em 1957, quando dois pesquisadores, Kalow e Genest, criaram um teste de inibição enzimática que permitiu classificar fenótipos, por meio da porcentagem de inibição a inibidores diferenciais (KALOW e GENEST, 1957).

## 2.5 MÉTODO DE FENOTIPAGEM POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Nos casos de maior sensibilidade à succinilcolina, sugeriu-se que deveria haver uma variação atípica da BChE (KALOW, 1956). Foi a partir do método desenvolvido para detectar a presença dessa possível variante atípica, que se passou a classificar os indivíduos fenotipicamente (revisão em CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007). Este teste consiste em adicionar uma concentração de inibidor a uma solução onde estariam a BChE (soro ou plasma), um tampão e um substrato sobre o qual a enzima deveria agir e, posteriormente, analisar a porcentagem da enzima que teria, de fato, sofrido a inibição enzimática, em comparação à sua ação em um ensaio controle sem a presença do inibidor.

KALOW e STARON (1957) utilizaram essa metodologia, tendo como inibidor o anestésico local dibucaína. Dessa maneira, submeteram uma alíquota de soro humano diluído ao inibidor, e a atividade da BChE foi mensurada por um espectrofotômetro de alcance na faixa ultravioleta.

A concentração de  $10^{-5}$  M do inibidor utilizada e descrita no teste em questão permitiu a distinção de dois fenótipos diferentes e, conseqüentemente, possibilitou o discernimento das duas BChEs, pois a chamada usual (selvagem) apresentou uma inibição de cerca de 79%, enquanto que a denominada atípica, apresentou inibição de apenas 19%. Por isso, essa concentração passou a ser base para os testes descritos, e o grau de inibição, expresso em porcentagem, passou a ser denominado “Número de Dibucaína” ou DN (KALOW e STARON, 1957).

Outros inibidores, como a neostigmina, também podem ser utilizados para este procedimento com resultados similares, mas a dibucaína foi preferida em virtude de sua ação imediata sobre a enzima. Propôs-se que os DNs classifiquem três grupos: homozigotos usuais com DN superior a 70, isto é, mais de 70% da atividade da BChE é inibida; homozigotos atípicos com DN inferior a 20, ou seja, menos de 20% de inibição, e os DNs com valores entre 40 e 70 seriam próprios dos heterozigotos. Não foram encontrados valores de DN entre 20 e 40 (KALOW e STARON, 1957).

Com estes resultados, tornou-se clara a ocorrência de uma forma dita atípica, que possui uma menor porcentagem de inibição diante de inibidores positivamente carregados.

## 2.6 VARIANTES NÃO USUAIS DO GENE *BCHE*

O gene *BCHE* é um gene polimórfico para o qual já foram relatadas cerca de setenta mutações (CHAUTARD-FREIRE-MAIA E SOUZA, 2007), como mostrado na tabela 1. Antigamente, diferentes fenótipos e variantes puderam ser identificados com o uso de inibidores diferenciais e a comparação do nível de inibição promovido por eles. No entanto, atualmente não se utilizam mais métodos de inibição enzimática para detecção de variantes, visto que esta técnica pode não possibilitar a distinção entre variantes com taxas de inibição semelhante, mas com diferente nível protéico ou de atividade. A identificação das mutações passou a ser efetuada por análise direta do DNA, através de técnicas como PCR-SSCA, PCR-RFLP, seqüenciamento de DNA, entre outras.

**Tabela 1:** Variantes do gene *BCHE*<sup>a</sup>

| Nível de DNA <sup>b</sup> | Nível de Proteína <sup>c</sup> | Referência   |
|---------------------------|--------------------------------|--|
| <i>Exon 1</i>             |                                |  |
| <i>c.-116G&gt;A</i>       |                                | Bartels e cols. (1990)   |
| <i>Exon 2</i>             |                                |  |
| <i>c.9_11delCAT</i>       | <i>p.I4del</i>                 | Maekawa e cols. (1997)   |
| <i>c.16delA</i>           | <i>p.I6fs</i>                  | Bartels e cols. (1992b) Primo-Parmo e cols. (1996)                 |
| <i>c.35A&gt;G</i>         | <i>p.K12R</i>                  | Mikami e cols. (2008)  |
| <i>c.45G&gt;C</i>         | <i>p.G15G</i>                  | Mikami e cols. (2008)  |
| <i>c.71C&gt;T</i>         | <i>p.T24M</i>                  | Maekawa e cols. (1997)   |
| <i>c.82T&gt;A</i>         | <i>p.F28I</i>                  | Yen e cols. (2003)   |
| <i>c.98A&gt;G</i>         | <i>p.Y33C</i>                  | Primo-Parmo e cols. (1996)   |
| <i>c.109C&gt;T</i>        | <i>p.P37S</i>                  | Primo-Parmo e cols. (1996)   |
| <i>c.208G&gt;C</i>        | <i>p.D70H</i>                  | Boeck e cols. (2002)   |
| <i>c.209A&gt;G</i>        | <i>p.D70G (A)</i>              | McGuire e cols. (1989)   |
| <i>c.223G&gt;C</i>        | <i>p.G75R</i>                  | Souza e cols. (2005)   |
| <i>c.270A&gt;C</i>        | <i>p.E90D</i>                  | Souza e cols. (2005)   |
| <i>c.286A&gt;T</i>        | <i>p.N96Y</i>                  | Yen e cols. (2003)   |
| <i>c.297T&gt;G</i>        | <i>p.I99M</i>                  | Souza e cols. (2005)   |
| <i>c.298C&gt;T</i>        | <i>p.P100S</i>                 | Maekawa e cols. (1997) Takagi e cols. (1997);<br>Lu e cols. (1997) |
| <i>c.318_319insA</i>      | <i>p.N106fs</i>                | Yen e cols. (2003); On-Kei Chan e cols. (2005)                     |
| <i>c.344G&gt;A</i>        | <i>p.G115D</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1997)   |
| <i>c.351_353insAG</i>     | <i>p.G117fs</i>                | Nogueira e cols. (1990)  |
| <i>c.355C&gt;T</i>        | <i>p.Q119X</i>                 | Sudo e cols. (1996)  |
| <i>c.375A&gt;T</i>        | <i>p.L125F</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)   |
| <i>c.375_378delCA</i>     | <i>p.H126fsX128</i>            | Gätke e cols. (2007)   |
| <i>c.383A&gt;G</i>        | <i>p.Y128C</i>                 | Hidaka e cols. (1997a)   |
| <i>c.424G&gt;A</i>        | <i>p.V142M (H)</i>             | Jensen e cols. (1992)  |
| <i>c.486T&gt;C</i>        | <i>p.A162A</i>                 | Souza e cols. (2005)   |
| <i>c.510T&gt;G</i>        | <i>p.D170E</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)   |
| <i>c.514C&gt;T</i>        | <i>p.Q172X</i>                 | Gätke e cols. (2001)   |

**Tabela 1:** Variantes do gene *BCHE*<sup>a</sup> (continuação)

| Nível de DNA <sup>b</sup> | Nível de Proteína <sup>c</sup> | Referência                                      |
|---------------------------|--------------------------------|---|
| <i>c.551C&gt;T</i>        | <i>p.A184V (SC)</i>            | Greenberg e cols. (1995)                        |
| <i>c.592A&gt;G</i>        | <i>p.S198G</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)                      |
| <i>c.596G&gt;T</i>        | <i>p.A199V</i>                 | Sakamoto e cols. (1998)                         |
| <i>c.601G&gt;A</i>        | <i>p.A201T</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)                      |
| <i>c.607 T&gt;C</i>       | <i>p.S203P</i>                 | Hidaka e cols. (2001)                           |
| <i>c.728C&gt;T</i>        | <i>p.T243M (F-1)</i>           | Nogueira e cols. (1992)                         |
| <i>c.748A&gt;C</i>        | <i>p.T250P</i>                 | Maekawa e cols. (1995)                          |
| <i>c.765G&gt;C</i>        | <i>p.E255D</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)                      |
| <i>c.800A&gt;G</i>        | <i>p.K267R</i>                 | Maekawa e cols. (1997)                          |
| <i>c.811G&gt;T</i>        | <i>p.E271X</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)                      |
| <i>c.880G&gt;A</i>        | <i>p.V294M</i>                 | Mikami e cols. (2008)                           |
| <i>c.920T&gt;C</i>        | <i>p.L307P</i>                 | Manoharan e cols. (2006)                        |
| <i>c.943_943insA</i>      | <i>p.T315fs</i>                | Hidaka e cols. (1992)                           |
| <i>c.943A&gt;T</i>        | <i>p.T315S</i>                 | Liu e cols. (2002)                              |
| <i>c.983C&gt;A</i>        | <i>p.A328D</i>                 | Gätke e cols. (2007)                            |
| <i>c.988T&gt;A</i>        | <i>p.L330I</i>                 | Sudo e cols. (1997)                             |
| <i>c.997G&gt;T</i>        | <i>p.G333C</i>                 | Mikami e cols. (2008)                           |
| <i>c.1062_1076insALU</i>  | <i>p.K355insALU</i>            | Muratani e cols. (1991); Maekawa e cols. (2004) |
| <i>c.1093G&gt;C</i>       | <i>p.G365R</i>                 | Hada e cols. (1992); Hidaka e cols. (1992)      |
| <i>c.1156C&gt;T</i>       | <i>p.R386C</i>                 | Yen e cols. (2003)                              |
| <i>c.1169G&gt;T</i>       | <i>p.G390V (F-2)</i>           | Nogueira e cols. (1992)                         |
| <i>c.1200C&gt;A</i>       | <i>p.C400X</i>                 | Hidaka e cols. (1997b)                          |
| <i>c.1253T&gt;C</i>       | <i>p.F418S</i>                 | Maekawa e cols. (1995)                          |
| <i>c.1270C&gt;T</i>       | <i>p.R424X</i>                 | Yen e cols. (2003)                              |
| <i>c.1273T&gt;C</i>       | <i>p.S425P</i>                 | Gnatt e cols. (1990)                            |
| <i>c.1294G&gt;T</i>       | <i>p.E432X</i>                 | Levano e cols. (2005)                           |
| <i>c.1303G&gt;A</i>       | <i>p.G435R</i>                 | Dey e cols. (1997)                              |
| <i>c.1336T&gt;G</i>       | <i>p.F446V</i>                 | Dey e cols. (1998)                              |



**Tabela 1:** Variantes do gene *BCHE*<sup>a</sup> (continuação)

| Nível de DNA <sup>b</sup> | Nível de Proteína <sup>c</sup> | Referência  |
|---------------------------|--------------------------------|---|
| <i>c.1351G&gt;T</i>       | <i>p.E451X</i>                 | Dey e cols. (1998)                                  |
| <i>c.1378G&gt;A</i>       | <i>p.E460K</i>                 | Yen e cols. (2003)                                  |
| <i>c.1393A&gt;T</i>       | <i>p.R465X</i>                 | Maekawa e cols. (1995)                              |
| <i>c.1408C&gt;T</i>       | <i>p.R470W</i>                 | Mikami e cols. (2008)                               |
| <i>c.1411T&gt;C</i>       | <i>p.W471R</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)                          |
| <i>c.1420T&gt;C</i>       | <i>p.F474L</i>                 | On-Kei Chan e cols. (2005)                          |
| <i>Íntron 2</i>           |                                |   |
| <i>c.IVS2-8T&gt;G</i>     |                                | Primo-Parmo e cols. (1996)                          |
| <i>Exon 3</i>             |                                |   |
| <i>c.1490A&gt;T</i>       | <i>p.E497V (J)</i>             | Bartels e cols. (1992a)                             |
| <i>c.1500T&gt;A</i>       | <i>p.Y500X</i>                 | Bartels e cols. (1992b); Primo-Parmo e cols. (1996) |
| <i>c.1543C&gt;T</i>       | <i>p.R515C</i>                 | Maekawa e cols. (1995)                              |
| <i>c.1553A&gt;T</i>       | <i>p.Q518L</i>                 | Primo-Parmo e cols. (1996)                          |
| <i>Íntron 3</i>           |                                |   |
| <i>c.IVS3-14T&gt;C</i>    |                                | Gätke e cols. (2007); Parmo-Folloni e cols. (2008)  |
| <i>Exon 4</i>             |                                |   |
| <i>c.1615G&gt;A</i>       | <i>p.A539T (K)</i>             | Bartels e cols. (1992b)                             |
| <i>c.1719_1720delT</i>    | <i>p.L574fsX576</i>            | Parmo-Folloni e cols. (2008)                        |
| <i>c.*189 A&gt;G</i>      |                                | Bartels e cols. (1990)                              |

FONTE: <sup>a</sup>CHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA, 2007 (atualizado); <sup>b</sup>Glu 1 é o amino ácido N-terminal da BChE madura e o nt 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo no códon para Glu 1; <sup>c</sup>Nome trivial entre parênteses.

### 2.6.1 VARIANTE ATÍPICA 209A>G (*p. D70G*)

A forma atípica da BChE, também chamada de resistente à dibucaína, foi a primeira variante genética a ser detectada. A incapacidade da variante atípica em hidrolisar a succinilcolina deve-se a sua baixa afinidade aos ésteres de colina, que normalmente se ligariam ao sítio aniônico da enzima. Todavia, como a variante atípica não apresenta uma menor afinidade a ésteres orgânicos neutros, que interagem com o sítio esterásico da BChE, propôs-se que essa variante representa uma alteração estrutural no sítio aniônico.

McGUIRE e cols. (1989) mostraram que a variante atípica é ocasionada por uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (exon 2) do gene *BCHE*. Isso acarreta uma substituição de uma adenina (GAT) por uma guanina (GGT), levando à troca do ácido aspártico 70 por uma glicina, ou seja, a substituição de um aminoácido ácido por um aminoácido neutro, o que explica a perda de afinidade da BChE atípica por substratos positivamente carregados (McGUIRE e cols., 1989).

Também conhecida por mutação A ou *p.D70G*, no presente trabalho convencionou-se denominar a mutação por *70G*, sendo resultante de mudança no nucleotídeo 209 (*209A>G*). Assim, a variante usual da BChE é tratada por *70D*: *70DD* é o homozigoto usual ou selvagem, *70GG* o homozigoto atípico e *70DG*, o heterozigoto. Os alelos são denominados *70D* e *70G*.

Na população caucasóide, o alelo *70G* tem, em média, uma frequência aproximada de 2%, tanto evidenciado por métodos de inibição enzimática (WHITTAKER, 1986), como por análise do DNA (MIKAMI e cols., 2008).

Em estudo anterior (GOMES, 2007 e GOMES e cols., 2008) foi verificada uma associação entre a variante *70G* da BChE e a hanseníase. No trabalho de 2008, foram analisadas amostras populacionais de 86 hansenianos e 86 controles através da técnica de PCR-SSCA. No grupo dos doentes foram encontrados 10 heterozigotos *70DG* (11,6%) e, nos controles, foram encontrados apenas dois *70DG* (2,3%), mostrando frequência significativamente maior de heterozigotos nos pacientes ( $\chi^2_{\text{corrigido}}$  de 4,39;  $p = 0,0362$ ), o que sugere associação. Valores de *odds ratio* foram estimados comparando-se os pacientes com seus controles (OR = 5,53; IC 95% de 1,17 a 26,03) e com uma amostra de 361 doadores de sangue de Curitiba (MIKAMI, 2005; OR = 3,52; IC 95% de 1,49 a 8,33), sendo que os heterozigotos *70DG* têm, em ambos os casos, maior chance de apresentar a hanseníase do que os homozigotos selvagens.

É preciso levar em consideração que existem outras variantes em desequilíbrio de ligação com a mutação atípica e que podem exercer alguma influência na associação com a hanseníase. Entre essas variantes, pode-se citar a *K* (*539T*), pois a variante *70G* é encontrada preferencialmente na conformação *cis* com *539T* (BARTELS e cols., 1992b). Além desta, a variante *-116A* é encontrada preferencialmente na conformação *cis* com a variante *539T* (BARTELS e cols., 1990), tendo sido associada à diminuição de cerca de 30% na atividade da BChE (FURTADO-ALLE e cols., 2008). Entretanto, a variante *-116A* está preferencialmente em *cis* com *70D* (NUNES, 2007). As frequências de *539T* e de *-116A* em Curitiba foram, respectivamente, de 18% (SOUZA e cols., 1998) e de 9% (FURTADO-ALLE e cols., 2008).

Devido ao desequilíbrio de ligação, os SNPs *G-116A* e *A539T* também serão analisadas nesse projeto, buscando-se elucidar melhor a relação entre a hanseníase e a BChE.

### 2.6.2 VARIANTE 208G>C (p. D70H)

Esta variante ocorre no exon 2, na mesma trinca que a variante *D70G*, mas a *D70H* se origina de uma mutação de ponto no nucleotídeo 208, substituindo uma guanina (GAT) por uma citosina (CAT) e, consequentemente, substituído um ácido aspártico por uma histidina na proteína, isto é, há a troca de um aminoácido negativamente carregado por um positivamente carregado, diminuindo, dessa forma, a afinidade da enzima por substratos positivamente carregados (BOECK e cols., 2002).

Vale ressaltar que não há trabalhos sobre a frequência populacional da variante *D70H*, que pode ser uma variante extremamente rara. Pelo fato dessa variante ocorrer no nucleotídeo anterior ao de *D70G* é possível que uma técnica como a de PCR-SSCA não consiga discernir entre as duas variantes. De modo que para identificá-la, seria necessária uma técnica específica para esta mutação, como seqüenciamento ou PCR-RT *Taqman*, por exemplo.

### 2.6.3 VARIANTE -116G>A

Esta mutação ocorre no exon 1 na posição -116, região que é transcrita, mas não é traduzida, não havendo, portanto, modificação de aminoácido. Sua frequência populacional foi descrita em norte-americanos como sendo de aproximadamente 8% (BARTELS e cols., 1990). Em caucasóides de Curitiba sua frequência alélica é de 9% (FURTADO-ALLE e cols., 2008).

### 2.6.4 VARIANTE 1615G>A (p. A539T)

Também conhecida como *K*, em homenagem a Werner Kalow, esta variante é decorrente de uma mutação de ponto no nucleotídeo 1615 do exon 4, substituindo a guanina (GCA) por uma adenina (ACA), o que leva à alteração do aminoácido alanina 539 para treonina (BARTELS e cols., 1992a).

A variante *K(539T)* foi descrita por RUBISTEIN e cols. (1978) e foi originalmente associada a uma redução em 33% na atividade da BChE, devido ao menor número de moléculas circulantes, se comparada com a da BChE usual, podendo essa redução ser devida a menor síntese da enzima ou à aceleração na degradação desta. Entretanto, FURTADO-ALLE e cols. (2008) mostraram que a redução na atividade da BChE só ocorre quando a mutação *539T* está em cis com a mutação *-116A*.

Sua frequência alélica em caucasóides norte-americanos foi estimada em 12.8% (BARTELS e cols., 1992b). Na população euro-brasileira, a frequência alélica corresponde a

18,4%, ao passo que a afro-brasileira apresenta 17,1%, não mostrando diferença estatisticamente significativa (SOUZA e cols., 1998).

## 2.7 RELAÇÃO ENTRE BUTIRILCOLINESTERASE E HANSENÍASE

Há muito tempo, especula-se sobre uma possível relação existente entre a BChE e a hanseníase, e existem evidências que sustentaram primeiramente essa hipótese, como por exemplo a ocorrência de apnéia prolongada em hansenianos, após utilização do relaxante muscular succinilcolina (VARKEY, 1968, observações não publicadas; *apud* THOMAS e cols., 1976). Na época em que os primeiros estudos sobre o nível de atividade da BChE foram realizados em hansenianos, já se possuía o conhecimento da existência de variantes não usuais da BChE e o propósito desses estudos era comparar os níveis da atividade enzimática em indivíduos saudáveis e em pacientes, com a finalidade de se elucidar possíveis fatores genéticos da hanseníase (THOMAS e JOB, 1972).

A metodologia utilizada nesses estudos era a da inibição enzimática pelo uso da dibucaína, estimando-se o DN para a classificação dos fenótipos (KALOW e GENEST, 1957). Com essa metodologia, diferentes resultados foram achados em estudos de associação.

THOMAS e cols. (1976), examinando amostras coletadas na Índia, encontraram diferença estatisticamente significativa entre as distribuições dos fenótipos da BChE no total de afetados, quando comparadas com controles normais ( $p < 0,001$ ; tabela 2). Além disso, quando foram comparadas as frequências de heterozigotos e de homozigotos usuais entre os grupos tuberculóide e controle, a diferença também foi significativa ( $p < 0,001$ ). Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o tuberculóide, quando se consideraram os homozigotos atípicos. Houve diferença significativa quando os grupos tuberculóide e lepromatoso foram comparados em relação aos três grupos de DN, conforme pode ser visto na tabela 2.

**Tabela 2:** Distribuição de DN entre pessoas saudáveis e hansenianos.

| Tipo de amostra          | DN           |       |                                    |       |   |      |       |
|--------------------------|--------------|-------|------------------------------------|-------|---|------|-------|
|                          | > 70 (usual) |       | 40-70<br>(heterozigoto<br>atípico) |       | Abaixo de 40<br>(homozigoto<br>atípico) |      | Total |
|                          | No.          | %     | No.                                | %     | No.                                     | %    |       |
| Normais                  | 701          | 97,36 | 18                                 | 2,50  | 1                                       | 0,14 | 720   |
| Hansenianos <sup>1</sup> |              |       |                                    |       |   |      |       |
| Lepromatoso              | 209          | 49,78 | 183                                | 43,57 | 28                                      | 6,60 | 420   |
| Tuberculóide             | 191          | 63,46 | 108                                | 35,88 | 2                                       | 0,66 | 301   |
| Total                    | 400          | 55,48 | 291                                | 40,36 | 30                                      | 4,16 | 721   |

<sup>1</sup>Classificados de acordo com Ridley (*apud* RIDLEY E JOPLING, 1966). Fonte: THOMAS e cols. (1976).

AGARWAL e cols. (1973), por sua vez, encontraram distribuições de frequência semelhantes, quanto às variações usual e atípica, tanto comparando controles normais com pacientes hansenianos, quanto comparando as diferentes formas clínicas da doença, conforme pode ser visto na tabela 3, cujos dados nem precisaram ser comparados por teste estatístico..

**Tabela 3:** Porcentagem de inibição da butirilcolinesterase pela dibucaína (DN) entre pessoas saudáveis e pacientes hansenianos da Etiópia.

| DN              |              |       |                                    |      |   |      |       |
|-----------------|--------------|-------|------------------------------------|------|---|------|-------|
| Tipo de amostra | > 70 (usual) |       | 40-70<br>(heterozigoto<br>atípico) |      | Abaixo de 40<br>(homozigoto<br>atípico) |      | Total |
|                 | No.          | %     | No.                                | %    | No.                                     | %    |       |
| Normais         | 142          | 94,70 | 7                                  | 4,70 | 1                                       | 0,66 | 150   |
| Hansenianos     |              |       |                                    |      |   |      |       |
| Lepromatoso     | 101          | 96,20 | 4                                  | 3,80 |   |      | 105   |
| Tuberculóide    | 85           | 96,60 | 3                                  | 3,40 |   |      | 88    |
| Borderline      | 12           | 92,30 | 1                                  | 7,70 |   |      | 13    |

Fonte: Agarwal e cols. (1973).

THOMAS e JOB (1972) já haviam achado um resultado semelhante ao que depois foi encontrado em seu trabalho de 1976. Por sua vez, SUNEETHA e cols. (2004) não observaram decréscimo nos níveis de BChE em pacientes hansenianos se comparados com controles normais, mas não consideraram as variantes da BChE para o estudo.

WHITTAKER e cols. (1976) estudaram outras variantes da BChE além da atípica em amostra africana da Rodésia. Em sua amostra de pacientes, não acharam nenhum indivíduo com o alelo para a variante atípica. Além disso, salientaram que nenhum dos estudos anteriores incluiu dados sobre a incidência da variante resistente ao fluoreto, sugerindo inclusive que alguns dos genótipos encontrados por THOMAS e cols. (1976) poderiam incluir o alelo de resistência ao fluoreto. Ainda assim, embora tenham estudado outras variantes do gene, concluíram que não havia diferença significativa nas frequências alélicas de pacientes hansenianos, quando comparados aos controles (WHITTAKER e cols., 1976).

O confronto desses diferentes resultados gerou dúvida quanto à existência de associação entre a presença da variante atípica da BChE e a hanseníase. É possível que a presença do alelo 70G possa deixar o indivíduo mais susceptível à doença. Entretanto, os resultados discordantes poderiam ser devidos à metodologia utilizada para a fenotipagem, que eventualmente poderia ter sido afetada por medicação usada pelos pacientes (WHITTAKER e cols., 1976). Além disso, pacientes com hanseníase podem apresentar danos nas células parenquimáticas no fígado, o que

levaria a um decréscimo nos níveis da BChE, com possibilidade de afetar o resultado da fenotipagem (BULAKH e cols., 1985).

Em suma, quando pacientes afetados foram comparados com controles normais, alguns estudos mostraram aumento significativo quanto à frequência da variante *70G* em pacientes, enquanto outros estudos não encontraram qualquer diferença. Foram encontrados níveis elevados de colinesterases (BChE e AChE) não apenas no soro de pacientes, mas também nos seus nervos e em sua pele (SUNEETHA e cols., 2002), enquanto ausência de diferença nesses níveis também foi relatada (SUNEETHA e cols., 2004). Dessa forma, os dados já publicados foram inconclusivos para se postular se variante da BChE poderia, de alguma forma, aumentar a susceptibilidade à hanseníase.

Pelo fato de os trabalhos anteriores (GOMES, 2007 e GOMES e cols., 2008) terem encontrado correlação positiva entre a variante *70G* e a doença, este projeto visou a analisar a variante *70G* em uma amostra maior de doentes e controles, bem como as variantes *-116A* e *539T* do gene *BCHE*, e de variantes de SNPs próximos a esse gene, que podem ser as que de fato exerçam alguma influência na susceptibilidade à doença.

## 2.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE COLINESTERASES, HANSENÍASE E RESPOSTA IMUNE

A susceptibilidade à hanseníase pode estar relacionada a variantes do gene *BCHE*, mas a possível razão fisiológica desta relação permanece inexplicada. KAWASHIMA e FUJII (2000) relatam a existência de um sistema colinérgico extra-neuronal na regulação das células do sistema imune, uma vez que leucócitos mononucleares são responsáveis pela síntese de cerca de 60% da acetilcolina presente no sangue. Além disso, nesse mesmo estudo, foi mostrado que linfócitos T podem ser estimulados por fitohemaglutinina a produzir acetilcolina, levando ao aumento de síntese de colina, de acetiltransferase da colina, de acetilcolinesterase e de receptores colinérgicos. A acetiltransferase da colina é responsável pela síntese da acetilcolina, enquanto a acetilcolinesterase atua na hidrólise da acetilcolina, gerando colina e ácido acético. Considerando que os linfócitos T fazem contato direto com as células alvo, foi sugerido que mesmo uma pequena quantidade de acetilcolina, liberada destes linfócitos ativados, possa interagir com os receptores da célula alvo (KAWASHIMA e FUJII, 2000). Com base em dados de diminuição de acetilcolina em órgãos linfóides e em leucócitos mononucleares de ratos espontaneamente hipertensos e de camundongos MRL-lpr, que apresentavam deficiência de função das células T, esses autores sugeriram que a acetilcolina agiria como um fator autócrino e/ou parácrino de regulação da função imune.

A acetilcolina faz parte de uma via antiinflamatória parassimpática, de forma que, quando liberada interage com receptores nicotínicos da membrana macrofágica, o que desencadeia um sinal celular que impede a ação nuclear do NF- $\kappa$ B, inibindo assim a produção de TNF, IL-1, IL-6, IL-8, HMGB1 (*high-mobility group box 1*) e outras citocinas pró-inflamatórias. Em casos de macrófagos teciduais, esta via não inibe a produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 (TRACEY, 2002).

Esta via de regulação ocorre visando evitar um excesso de citocinas, que pode causar danos teciduais. A regulação de citocinas pelo cérebro ocorre pelo nervo vago, e sua estimulação *in situ* promove a inibição de citocinas pró-inflamatórias. A estimulação dos nervos vagos cervicais direitos ou esquerdos promove proteção contra hipotensão e inibe o TNF do soro, tendo ação antiinflamatória. Em uma situação anormal de inflamação, com desequilíbrio ou excesso de citocinas, esta via antiinflamatória colinérgica seria ativada para atuar na prevenção desse excesso, visto que doenças como depressão, anorexia, artrite e psoríase também já foram relacionadas a esse tipo de situação (TRACEY, 2007).

BULAKH e cols. (1982) avaliaram os níveis de colina no soro de 74 indivíduos com hanseníase tuberculóide, e encontraram um decréscimo estatisticamente significativo nos níveis de colina. Consideramos que esses resultados podem indicar deficiência na produção de células T, com base no que foi proposto por KAWASHIMA e FUJII (2000).

A hipótese do presente trabalho é que a relação da acetilcolina com o sistema imune poderia ser uma das razões fisiológicas do desenvolvimento da hanseníase, pois altos níveis de acetilcolina significam uma diminuição na resposta imune inflamatória, o que poderia diminuir a reação do hospedeiro à infecção pelo *M. leprae*. Os altos níveis de acetilcolina podem levar a uma redução de atividade da acetilcolinesterase, por ela ser inibida por excesso de substrato (HERZ e KAPLAN, 1973).

Considerando que a BChE não sofre este mesmo tipo de inibição, ficaria para ela a função de degradar a acetilcolina. Essa poderia ser uma relação entre a BChE e a hanseníase, no sentido de que uma enzima variante, como a atípica, com menos afinidade pela acetilcolina, pudesse interferir no sistema de sua regulação imune, não conseguindo diminuir seu excesso e dificultando a resposta imunológica, como a da inibição das citocinas pró-inflamatórias, o que também favoreceria a instalação da doença.

### 3. OBJETIVOS

No presente trabalho, visou-se:

- 1 – Ampliar o tamanho da amostra de hansenianos e de controles, estudada anteriormente (GOMES, 2007) e verificar as frequências da mutação atípica (*70G*) em cada uma delas.
- 2 – Verificar as frequências das variantes dos sítios –116 e 1615 e de SNPs a montante e a jusante do gene *BCHE*.
- 3 – Estimar as frequências haplotípicas quanto aos sítios examinados, em hansenianos e controles.
- 4 – Verificar se ocorre associação entre a hanseníase e as variações estudadas, considerando-as independentemente e nos haplótipos.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Neste projeto foi utilizada uma abordagem de estudo de associação caso-controle, com amostras de 167 hansenianos (116 multibacilares e 51 paucibacilares) e 150 controles, coletadas sob a orientação do Dr. Marcelo Mira da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. O único critério de exclusão foi não ser consanguíneo de afetado ou de controle já coletado para o estudo. Esta amostra inclui a anteriormente estudada por GOMES (2007) e foi coletada em diversas cidades do estado do Paraná.

#### 4.1.1 Amostra de Hansenianos

O diagnóstico clínico e laboratorial, bem como a classificação dos tipos clínicos da hanseníase da população paranaense, foram feitos por médicos especialistas do Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia/Aliança Saúde e da Fundação Pró Hansen.

Pacientes selecionados junto a estes serviços de Dermatologia e que já completaram o tratamento foram incluídos no estudo, visto que foi possível o acesso aos dados clínicos desses pacientes através da consulta aos seus respectivos prontuários.

A idade dos pacientes não foi critério de exclusão dos mesmos, sendo a média de idade de  $55,24 \pm 3,89$  anos; o paciente mais jovem possui 8 anos (nascido em 2001) e o paciente com mais idade, 90 anos (nascido em 1919). Dois pacientes não tiveram sua data de nascimento identificada (Tabela 4).

**Tabela 4:** Número e porcentagem de pacientes por data de nascimento<sup>a</sup>.

| Data de nascimento | Número de Pacientes | %                |
|--------------------|---------------------|------------------|
| 1919 a 1940        | 33                  | $20,00 \pm 3,10$ |
| 1941 a 1960        | 80                  | $48,48 \pm 3,89$ |
| 1961 a 1980        | 44                  | $26,67 \pm 3,44$ |
| 1981 a 2000        | 7                   | $4,24 \pm 1,57$  |
| 2001 em diante     | 1                   | $0,61 \pm 0,61$  |
| Total              | 165                 | 100,00           |

<sup>a</sup>Não foram obtidos dados sobre a data de 2 pacientes.

Assim, conforme observado, a maior porcentagem de nascimento entre os pacientes ocorreu entre os anos de 1941 a 1960 (48,48%). Entretanto, as datas dos diagnósticos são bem mais

recentes, conforme pode ser visto na tabela 5. Quatro pacientes não tiveram a data do diagnóstico identificada.

**Tabela 5:** Número e porcentagem de pacientes por data de diagnóstico<sup>a</sup>.

| Data de diagnóstico | Número de Pacientes | %            |
|---------------------|---------------------|--------------|
| 1961 a 1970         | 1                   | 0,61 ± 0,61  |
| 1971 a 1980         | 3                   | 1,84 ± 1,05  |
| 1981 a 1990         | 9                   | 5,52 ± 1,79  |
| 1991 a 2000         | 36                  | 22,08 ± 3,25 |
| 2001 em diante      | 114                 | 69,94 ± 3,59 |
| Total               | 163                 | 100,00       |

<sup>a</sup>Não foram obtidos dados sobre a data de diagnóstico de 4 pacientes.

O sexo também não foi fator de exclusão para a composição do grupo amostral, sendo que do total de 167 pacientes analisados, 96 eram homens (57%) e 71 (43%) eram mulheres, sendo que esta diferença não é estatisticamente significativa ( $\chi^2_{(1)} = 3,74$ ;  $p > 0,05$ ). A distribuição étnica está mostrada na tabela 6, onde se observa que a contribuição predominante é de caucasóides. Não há diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições étnicas de hansenianos multi e paucibacilares ( $\chi^2_{(3)} = 3,72$ ;  $p > 0,20$ ).

**Tabela 6:** Número e porcentagem de pacientes por grupo étnico<sup>a</sup>.

| Grupo étnico | Número de Pacientes | %            |
|--------------|---------------------|--------------|
| Caucasóide   | 116                 | 76,32 ± 3,45 |
| Pardo        | 27                  | 17,76 ± 3,10 |
| Negro        | 8                   | 5,26 ± 1,81  |
| Asiático     | 1                   | 0,66 ± 0,66  |
| Total        | 152                 | 100,00       |

<sup>a</sup>Não foram obtidos dados sobre a etnia de 15 pacientes.

Os pacientes foram coletados em cinco cidades do Paraná: Curitiba e região metropolitana (25°25'40" S e 49°16'23" W), sendo tratados pela Fundação Pró Hansen; Prudentópolis (25°12'47" S e 50°58'40" W); Pato Branco (26°13'46" S e 52°40'14" W); Piraquara (25°26'30" S e 49°03'08" W) e São Jerônimo da Serra (23°43'40" S e 50°44'27" W), conforme pode ser visto na tabela 7.

Quanto às formas clínicas, foram analisados 51 pacientes com a forma paucibacilar (30,54%) e 116 com a forma multibacilar (69,46%).

**Tabela 7:** Número e porcentagem de pacientes por cidade de origem.

| Cidade                         | Número de Pacientes | Porcentagem  |
|--------------------------------|---------------------|--------------|
| Curitiba (Fundação Pró Hansen) | 72                  | 43,11 ± 3,83 |
| Prudentópolis                  | 32                  | 19,16 ± 3,04 |
| Pato Branco                    | 11                  | 6,59 ± 1,92  |
| Piraquara                      | 3                   | 1,80 ± 1,03  |
| São Jerônimo da Serra          | 49                  | 29,34 ± 3,52 |
| Total                          | 167                 | 100,00       |

#### 4.1.2 Escolha dos controles

Os controles foram selecionados tendo como critério o fato de terem convivido com hansenianos, mas não terem contraído o *M. leprae* e, conseqüentemente, não terem desenvolvido a doença. Além disso, os controles escolhidos não são consanguíneos entre si e nem de pacientes estudados nessa amostra.

Todos os controles foram coletados na cidade de Piraquara, PR, onde se localiza o Hospital São Roque, que trata de pacientes com a doença. Os controles são essencialmente funcionários desse hospital, trabalham em suas imediações ou são moradores vizinhos do hospital.

A idade média dos controles é de 46,08 ± 4,09 anos, sendo que o controle mais jovem possui 11 anos (nascido em 1998) e o mais idoso, 84 anos (nascido em 1925). A distribuição de idade dos controles está na tabela 8.

**Tabela 8:** Número e porcentagem dos controles por datas de nascimento.

| Data        | Número Controles | %            |
|-------------|------------------|--------------|
| 1921 a 1940 | 16               | 10,67 ± 2,50 |
| 1941 a 1960 | 50               | 33,33 ± 3,88 |
| 1961 a 1980 | 62               | 41,33 ± 4,03 |
| 1981 a 2000 | 22               | 14,67 ± 2,89 |
| Total       | 150              | 100,00       |

Quanto ao sexo, os controles são representados por 67 homens (45%) e 83 mulheres (55%) e, no que tange à distribuição da etnia, não ocorreram casos não identificados e a amostra é semelhante à dos pacientes ( $\chi^2_{(4)} = 3,74$ ;  $p = 30\%$ ), embora apresente um indivíduo indígena e dois indivíduos de origem asiática (tabela 9).

**Tabela 9:** Número e porcentagem de controles por grupo étnico.

| Classificação | Número de Controles | %            |
|---------------|---------------------|--------------|
| Caucasóide    | 102                 | 68,00 ± 3,81 |
| Pardo         | 38                  | 25,33 ± 3,55 |
| Negro         | 7                   | 4,67 ± 1,72  |
| Asiático      | 1                   | 0,67 ± 0,66  |
| Indígena      | 2                   | 1,33 ± 0,94  |
| Total         | 150                 | 100,00       |

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Coleta das amostras e extração do DNA

O DNA foi obtido a partir de sangue total. Foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa em tubos do tipo Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante, em condições ideais de assepsia.

O DNA foi extraído das amostras de sangue total pelo método de *salting out* (MILLER e cols., 1988) e as amostras de DNA obtidas foram armazenadas em freezer a cerca de -80°C, como soluções estoque. A concentração das soluções estoque foi determinada por espectrofotometria, e as amostras foram diluídas para uso a uma concentração aproximada de 20 ng/μL. As soluções de DNA utilizadas para as análises foram armazenadas em freezer a -20°C.

### 4.2.2 PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Para cada amostra genotipada para a variante 539T, foi amplificado um segmento de DNA de 1789pb (do nucleotídeo -31 ao 1758), que contém o nucleotídeo 1615. A amplificação foi feita de acordo com SOUZA e cols. (2005), com modificações de MIKAMI (2005), usando os seguintes iniciadores: P45 5' TGA TTA ATA CCA CTT ATT CC 3' e P43 5' GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG 3'. As reações de amplificação foram realizadas com volume total de reação de 10 μL, sendo 9 μL de PCR Supermix (Invitrogen – 22 mM Tris HCl pH 8,4; 55 mM KCl; 1,65 mM MgCl<sub>2</sub>; 220 μM dATP; 220 μM dTTP; 220 μM dCTP; 220 μM dGTP; 22 U/mL de Taq polimerase), 1 μL de solução de DNA (cerca de 20 ng) e 10 pmoles de cada iniciador. As PCRs ocorreram em um termociclador Techgene Ftagene 2D, com o seguinte programa de amplificação: a) 80 ° C por 30 s.; b) 94 ° C por 30 s.; c) 48 ° C por 30 s.; d) 72° C por 30 s.; e) repetição de 35 vezes dos passos b ao d; f) 72° C por 10 min. (extensão).

### 4.2.3 PCR - SSCA (Análise conformacional de fita simples)

A técnica de PCR-SSCA (*polymerase chain reaction – single strand conformational analysis*) foi descrita primeiramente por ORITA e cols. (1989) e consiste em, após realizar a amplificação por PCR da sequência de DNA que se deseja analisar, desnaturar o produto da PCR e submetê-lo à eletroforese para análise do DNA em fita simples. Esta técnica permite que sejam observadas alterações na conformação do DNA, mesmo as que podem ter sido geradas apenas por uma mutação de ponto. São detectadas mutações que causem uma alteração conformacional no DNA, que leve a modificar sua mobilidade eletroforética quando em fita simples.

A metodologia utilizada foi adaptada a partir da descrita por SOUZA e cols. (2005) e consiste em misturar 10 µL do produto da amplificação a 10 µL de uma solução com 95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 10mM de EDTA e 10 mM de NaOH. Em seguida, essa mistura é colocada a 94° C por 5 minutos e mantida resfriada em gelo antes de retirar 10 µL para eletroforese em gel de poliacrilamida. Em cada placa de gel de poliacrilamida é colocado, no mínimo, um heterozigoto para a mutação *K* como padrão para comparação.

#### 4.2.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os géis feitos foram preparados a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 29:1 (29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL), resultando em um gel com concentração de acrilamida de 9,0% e proporção de bisacrilamida em relação ao total de acrilamida de 3,4%.

Em seu preparo propriamente dito, foram utilizados 21mL de TBE 1X (Tris 54g, ácido bórico 27,5g, 20ml de EDTA 0,5 M, pH 8 e qsp 1000ml de água destilada), 9 mL de poliacrilamida, 30 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina) e 250 µL de persulfato de amônio (10%).

A solução tampão para preparo do gel foi de Tris-HCl 33 mM, pH 3,66. A eletroforese foi feita de maneira descontínua, de modo que na cuba se usou tampão TBE 1X. Os valores da voltagem e da amperagem foram de 250 V e 30 mA, os quais foram mantidos constantes durante toda a corrida, que foi de 22h. Foi feita também, uma pré-corrida de 30 minutos antes da aplicação das amostras, para uma melhoria na trama da poliacrilamida e um resultado mais evidente.

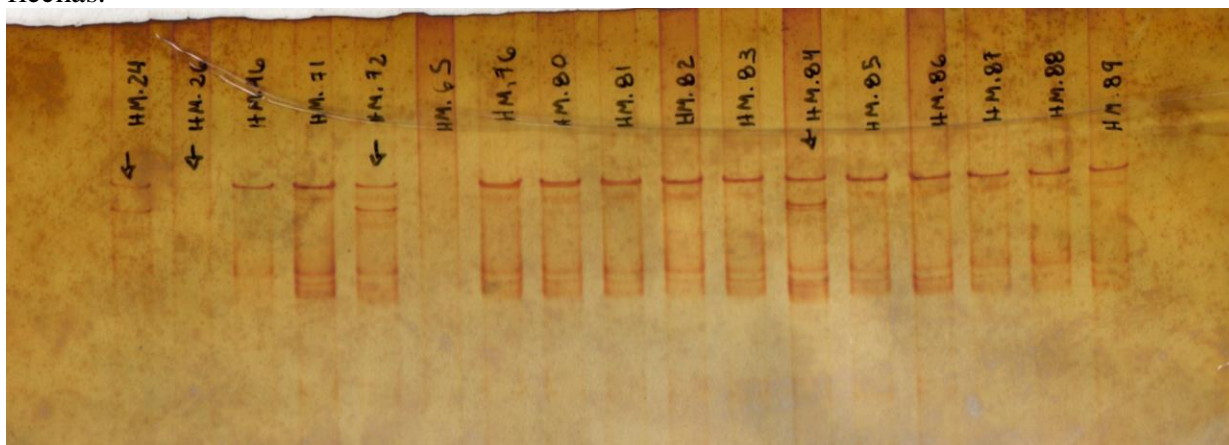
#### 4.2.3.2 Coloração do gel

A coloração do gel foi realizada com base na metodologia descrita por BUDOWLE e cols., 1991 (*apud* MIKAMI 2005), durante a qual o gel foi mantido sob agitação.

Depois da realização da eletroforese, a placa de gel foi imersa em solução de ácido nítrico (1%) durante três minutos. Após isso, foi lavada duas vezes com água destilada e imersa em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) e colocada por 30s em forno microondas na potência máxima. Tornou a ser lavada por duas vezes com água destilada, foi imersa em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96% e 92  $\mu$ L de formaldeído) e recolocada no microondas por mais 30s que é quando ocorre o escurecimento da solução. Após isso, retirou-se o gel dessa solução e foi acrescentado o restante da solução reveladora, na qual o gel foi mantido imerso e sob agitação constante até o aparecimento das bandas.

Com a revelação terminada, o gel foi lavado duas vezes com água destilada e mantido em uma solução de ácido acético (10%) por 5 min. Após isto, lavou-se novamente com água destilada por duas vezes e se acrescentou uma solução de glicerol (5%), na qual permaneceu por 10 min. Terminada esta etapa, iniciou-se a etapa de secagem do gel, na qual este foi embebido em solução de metanol (30%) e glicerol (1%) e colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução, mantendo-o esticado para que não se formassem bolhas.

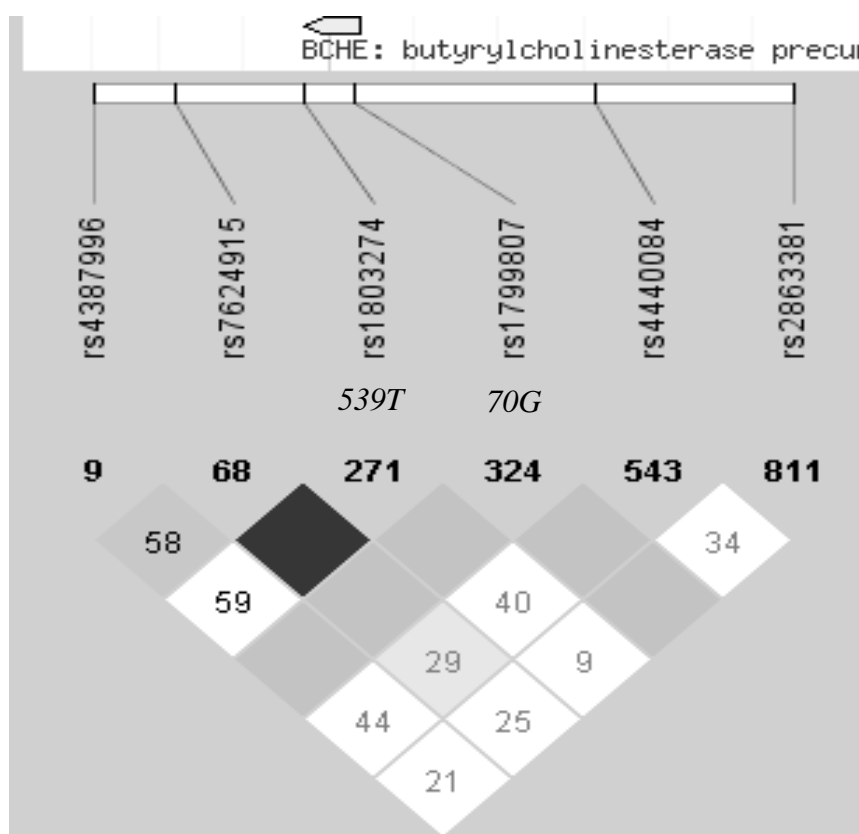
Finalmente, após a colocação sobre o celofane, o gel foi coberto com uma folha de papel filtro e colocado em uma prensa com o mesmo papel acima e abaixo dele, onde ficou até secar completamente. Antes de ser prensado, no entanto, sua imagem foi arquivada em computador através do uso de *scanner*. Sua armazenagem foi feita após as placas estarem completamente secas. Um exemplo de gel está na figura 2, na qual os heterozigotos estão evidenciados por flechas.



**Figura 2.** Exemplo de gel para A539T. Os heterozigotos estão evidenciados por flechas.

#### 4.2.4 Metodologia Taqman

A metodologia *Taqman* (Perkin Elmer Applied Biosystems), foi utilizada para genotipagem de seis SNPs: (*D70G* - rs1799807), (*A539T* - rs1803274), rs4387996, rs4440084, rs2863381 e *G-116A* (rs1126680), sendo que dois deles também foram genotipados pela técnica de PCR SSCA (rs1799807 e rs1803274). Três desses SNPs são externos ao gene *BCHE*, sendo que dois deles estão a montante (rs2863381, rs4440084) e um deles encontra-se a jusante (rs4387996), conforme pode ser visto na figura 3, que também mostra os SNPs referentes a *D70G* (rs1799807) e a *A539T* (rs1803274).



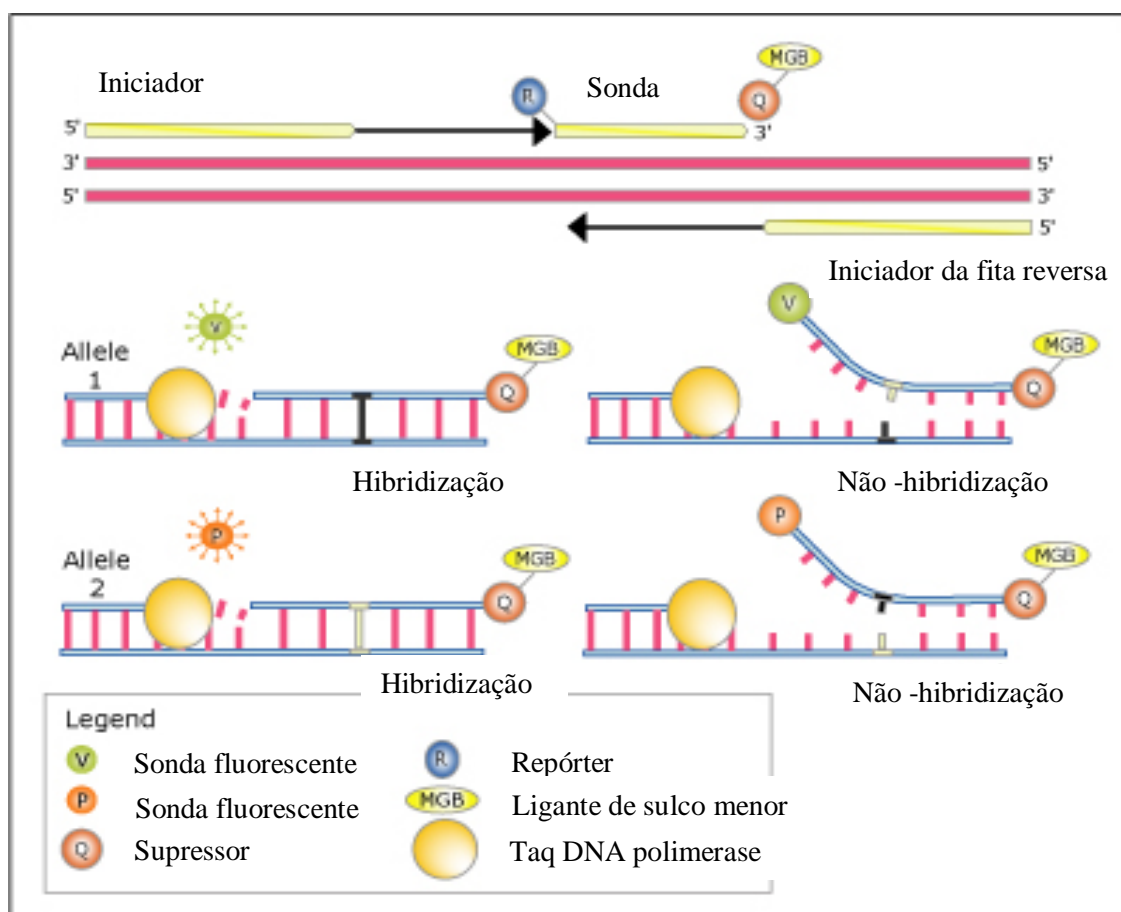
**Figura 3.** SNPs a jusante, próprios do gene *BCHE* e a montante, com os respectivos valores de  $D'$ (%). Os losangos de cor cinza representam valor de  $D' = 1,0$ . O losango de cinza escura também representa um valor de  $D' = 1,0$ , mas associado a um valor alto de *lod* score (6,93). O SNP referente à mutação -116A (rs126680) não está representado na figura devido à ausência de dados disponíveis sobre seus valores de  $D'$  no HapMap. Fonte: HAPLOVIEW 4.1 (BARRETT e cols., 2005).

Os SNPs a jusante e a montante do gene *BCHE* foram escolhidos com o auxílio de dados do HAPMAP (<http://www.hapmap.org>) e com o uso do programa HAPLOVIEW, tendo como critério principal apresentar preferencialmente frequências alélicas próximas de 50% na população caucasóide analisada no HAPMAP, cada um deles sendo representante de um bloco

de desequilíbrio de ligação. Suas respectivas frequências alélicas são: T = 68%, C = 32% (rs2863381); C = 47%, G = 53% (rs4440084) e A = 26%, G = 74% (rs4387996).

A metodologia *Taqman* utiliza a enzima Taq DNA Polimerase com atividade exonucleásica 5'-3', que digere uma sonda marcada, quando hibridizada de forma específica, em parte do segmento amplificado entre dois iniciadores. Esta sonda *Taqman* possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente com função repórter, isto é, que exibe fluorescência quando há complementaridade com o DNA examinado. Na extremidade 3', há uma molécula supressora (*quencher*) cuja função é ocultar o sinal fluorescente, caso a sonda não hibridize (ALMEIDA e SADDI, 2007).

À medida que a sonda hibridizada é clivada pela atividade exonucleásica da enzima Taq® DNA Polimerase, o efeito do supressor deixa de acontecer, liberando a fluorescência da sonda, de modo que este sinal fluorescente é captado pelo equipamento de PCR em tempo real, conforme representado pela figura 4.



**Figura 4.** Representação de uma genotipagem por PCR em tempo real (adaptado de SERCICEXS, 2010).



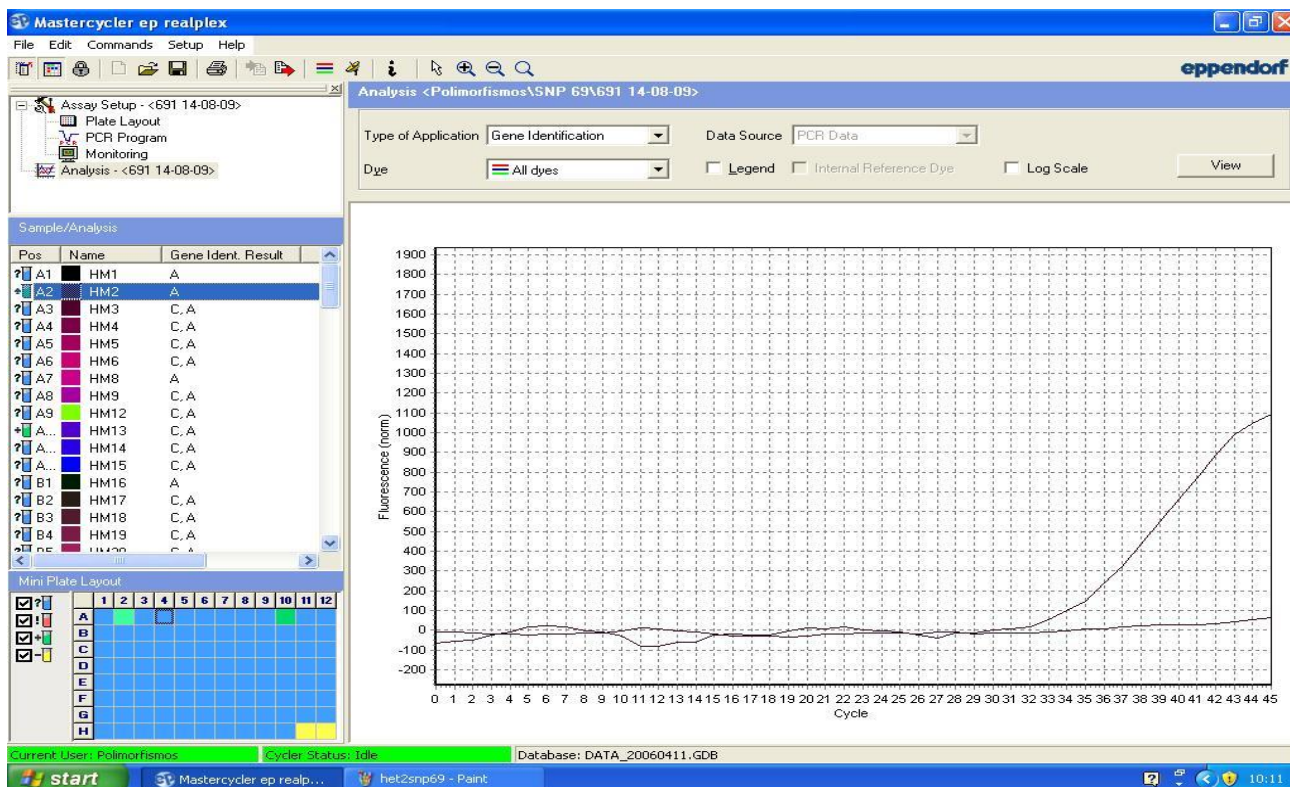
Para genotipagem destes SNPs, foi utilizado o kit de Genotipagem *Taqman SNP da Applied Biosystems*. Esse kit possui 2 iniciadores específicos não marcados por fluorescência e duas sondas, que são 2 oligonucleotídeos específicos, um para cada alelo, ambos marcados com diferentes fluorescências. O kit e o aparelho de PCR tempo real que foram usados permitem o uso de 2 fluoróforos: VIC e FAM.

As genotipagens foram feitas em um aparelho de PCR em tempo real, modelo *Realplex2* da marca Eppendorf. À medida que a amplificação acontece, o sinal de fluorescência vai sendo lido conforme o produto da reação de PCR vai sendo formado.

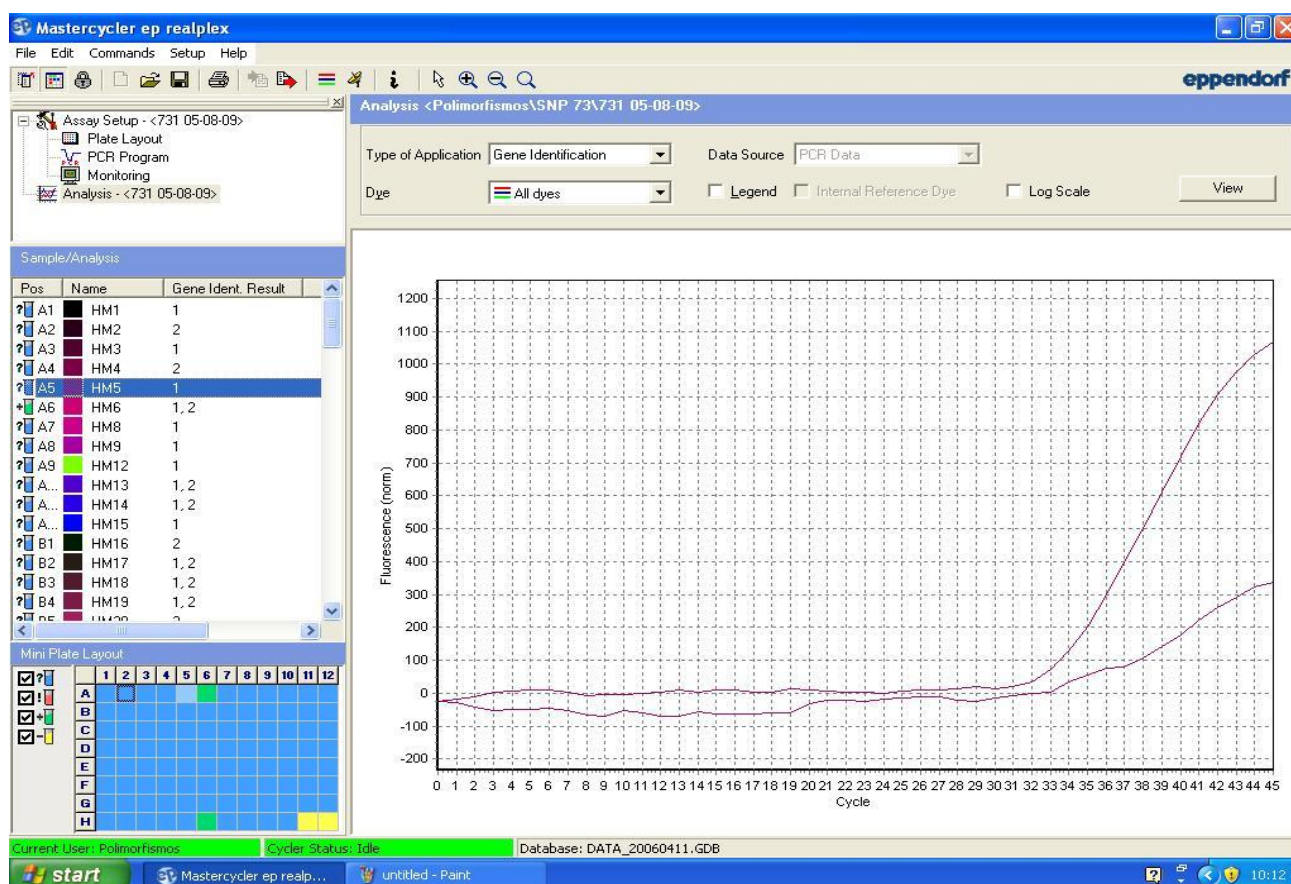
O protocolo que foi utilizado para as reações consistiu em preparo do mix, que contém 0,3 µL do Kit de Genotipagem *Taqman SNP* (iniciadores, nucleotídeos e sondas) específico para cada SNP, 5,0µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* (Taq polimerase) e 3,2 µL de água ultra-pura, totalizando 8,5 µL do mix por amostra. Neste mix, foram colocados 1,5 µL de solução de DNA (com concentração aproximada de 20 ng), perfazendo 10 µL como volume total de reação.

As amostras foram colocadas em uma placa para PCR, que possui espaço para 96 amostras. Contudo, utilizaram-se, em média, 91 poços para novas genotipagens, tendo em vista que três poços normalmente foram utilizados para os três controles (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutante) e dois “brancos”, nos quais, em vez do DNA, colocou-se água ultra pura, de modo que neles não pode ocorrer emissão de fluorescência, a menos que tenha havido contaminação na placa.

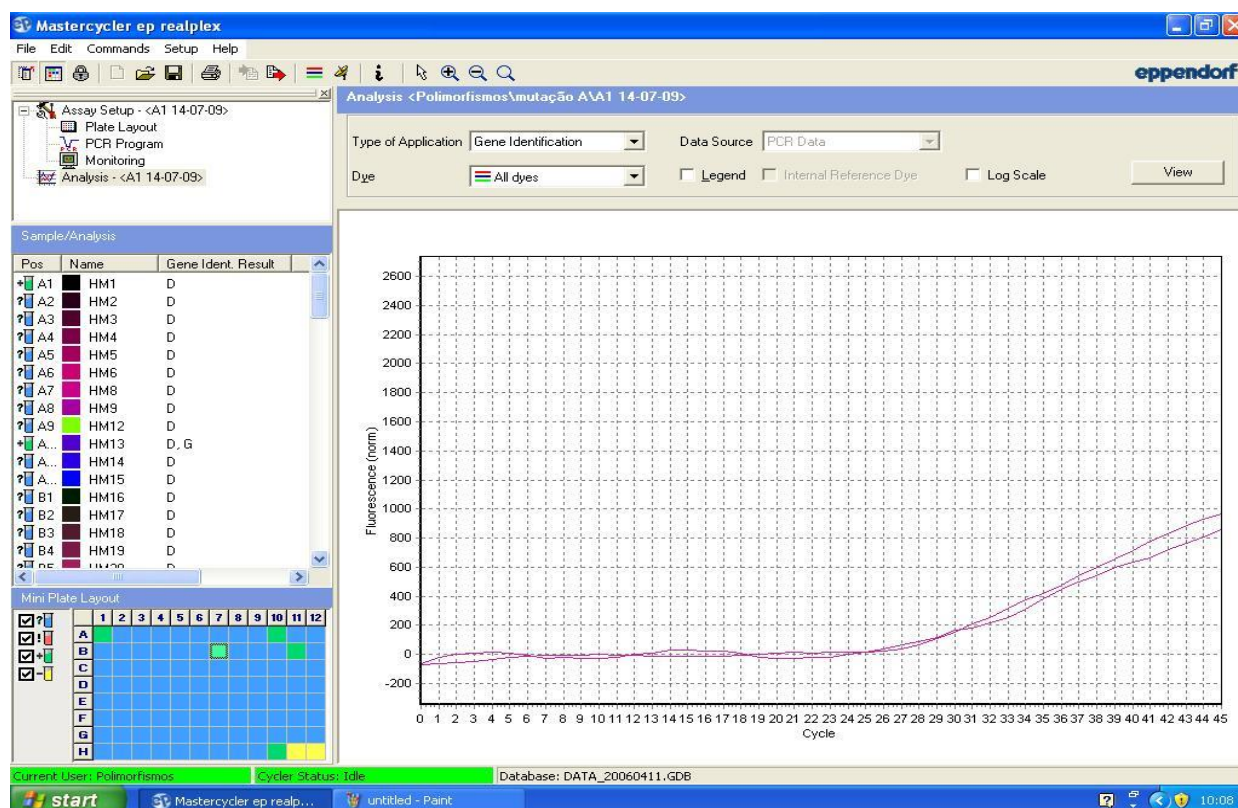
Após a montagem, a placa foi selada e levada ao aparelho, cuja interpretação consistiu basicamente de três etapas. A primeira é a pré-leitura, na qual ocorre a emissão de uma fluorescência basal, que precede a amplificação. A segunda etapa é a amplificação em si, que ocorreu com as seguintes condições: 1º: 50°C - 2 min; 2º: 95°C - 10 min; 3º: 95°C - 15 s (desnaturação) e 4º: 60°C – 1 min (Etapa de hibridização e extensão). Ocorreram 45 ciclos da 3ª a 4ª etapas descritas e a fluorescência foi lida após a fase de hibridização e extensão, o que resultou no genótipo dos indivíduos colocados na placa. A análise desses genótipos foi feita com base no gráfico que a fluorescência exhibe, conforme pode ser visto nas figuras 5, 6 e 7.



**Figura 5.** Exemplo de amostra homozigota para o alelo A (marcado por VIC) para o SNP rs4440084.



**Figura 6.** Exemplo de amostra homozigota para o alelo G (marcado por FAM) para o SNP rs4440084. Embora haja uma leve subida da curva referente ao alelo marcado por VIC, a curva do alelo marcado por FAM atinge níveis muito superiores de fluorescência.



**Figura 7.** Exemplo de amostra heterozigota (G/A) para a mutação A (70G) do rs1799807. As duas curvas de fluorescência, neste caso, sobem juntas e de forma aproximadamente paralela.

#### 4.2.5 Análise estatística dos resultados

A análise estatística foi feita com o uso do programa STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc., 2000; <http://www.statsoft.com>). Foram calculadas distribuições de frequência, médias, desvios padrão, erros padrão e foram feitas comparações com a utilização dos testes: t; exato de Fisher e  $\chi^2$ .

As frequências genóticas e alélicas foram calculadas por simples contagem. As distribuições de genótipos foram comparadas com as esperadas com base no equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo programa Arlequin 3.0 (EXCOFFIER e cols., 2005), de acordo com o teste de GUO e THOMPSON (1992). As frequências haplotípicas foram estimadas pelo mesmo programa, sendo inferidas a partir das frequências genóticas observadas, com base no método de verossimilhança máxima (EM; algoritmo da maximização da expectativa).

O desequilíbrio de ligação também foi inferido pelo mesmo programa, utilizando os parâmetros de D, D',  $r^2$  e testado pelo  $\chi^2$ . O teste de  $\chi^2$  é calculado da seguinte maneira:

$\chi^2 = 2nD^2/(p_A p_a p_B p_b)$ , sendo que p representa a frequência de cada alelo e D é estimado pela diferença entre as frequências gaméticas ( $D = p_{AB} p_{ab} - p_{Ab} p_{aB}$ ).

Para verificação do desequilíbrio de ligação, é necessário calcular o valor de  $D'$ , que é uma normalização, isto é, uma proporção de  $D$ , sobre o valor máximo que este poderia obter ( $D' = D/D_{\max}$ ).

O desequilíbrio também pode levar à correlação entre dois SNPs, que é estimada por  $r$ . O valor de  $r^2$  é correlato ao valor de  $D$  e é calculado da seguinte maneira:  $r^2 = D^2/(p_A p_a p_B p_b)$ . Assim, o valor de  $\chi^2$  também pode ser calculado por:  $\chi^2 = 2nr^2$  de maneira que o resultado final é aplicado tanto ao valor de  $D$  como de  $r^2$ .

#### 4.2.5.1 Odds Ratio

De posse dos dados das possíveis diferenças encontradas entre hansenianos e controles, foi calculado o valor de risco ( $OR = odds\ ratio$ ), de acordo com o método de WOOLF (1955), sendo que  $OR = (A \times D)/(B \times C)$ , como mostrado no quadro 1. O valor de  $OR$  só foi calculado quando, após o uso da correção de Bonferroni, a associação detectada continuava estatisticamente significativa ou quando já tínhamos uma hipótese a respeito da associação verificada.

**Quadro 1:** Representação esquemática do cálculo de *odds ratio*.

| Genótipo      | Pacientes | Amostra da população | Total |
|---------------|-----------|----------------------|-------|
| Heterozigotos | A         | B                    | T     |
| Homozigotos   | C         | D                    | Z     |
| Total         | X         | Y                    |       |

X e Y representam a soma de A+ C e B+D, respectivamente; T e Z representam a soma de A+B e C+D, respectivamente.

O valor de  $OR$  mostra a relação existente entre SNPs e o mal de Hansen. Valores de  $OR$  menores que 1, quando significativos, indicam uma associação de proteção entre o SNP e a doença, isto é, a presença de uma determinada variante poderia auxiliar para que a hanseníase não se desenvolva. Valores iguais a 1 não são significativos e significam que a probabilidade de desenvolvimento da doença não difere entre os grupos considerados. Entretanto, valores significativamente acima de 1 indicam que a presença do SNP está associada a uma maior

probabilidade de desenvolver a doença, revelando uma associação entre o fator considerado e a maior susceptibilidade à hanseníase.

A partir do valor de OR, foi calculado o Erro Padrão (EP) para o log de OR e, a partir destes dados, seu intervalo de confiança através da fórmula:

$$EP(\log OR) = \sqrt{1/A + 1/B + 1/C + 1/D}$$

Foi utilizado o intervalo de confiança (IC) de 95%, que para ser obtido, inicialmente usaram-se 1,96 erros padrões em qualquer direção em relação à estimativa do log de OR. Após isto, obteve-se o antilog desses dois limites, que é o IC ao nível de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS

As amostras de doentes e controlos foram submetidas à metodologia *Taqman* para genotipagem e a tabela 10 mostra as frequências genotípicas e alélicas obtidas.

**Tabela 10:** Dados de distribuição de frequência genotípica e alélica obtidos para os SNPs analisados.

| <b>rs2863381 (a montante do gene <i>BCHE</i>)</b> |               |                |                |              |              |
|---|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
|   | <i>TT</i> (%) | <i>TC</i> (%)  | <i>CC</i> (%)  | <i>T</i> (%) | <i>C</i> (%) |
| <b>Doentes (161)</b>                              | 58,39 ± 3,88  | 34,16 ± 3,74   | 7,45 ± 2,07    | 75,47 ± 2,41 | 24,73 ± 2,41 |
| Multibacilares (111)                              | 62,16 ± 4,60  | 30,63 ± 4,38   | 7,21 ± 2,45    | 77,48 ± 2,82 | 22,52 ± 2,82 |
| Paucibacilares (50)                               | 50,00 ± 7,07  | 42,00 ± 6,98   | 8,00 ± 3,84    | 71,00 ± 4,53 | 29,00 ± 4,53 |
| <b>Controles (143)</b>                            | 44,06 ± 4,15  | 49,65 ± 4,18   | 6,29 ± 2,03    | 68,88 ± 2,73 | 31,12 ± 2,73 |
| <b>rs4440084 (a montante do gene <i>BCHE</i>)</b> |               |                |                |              |              |
|   | <i>GG</i> (%) | <i>GC</i> (%)  | <i>CC</i> (%)  | <i>G</i> (%) | <i>C</i> (%) |
| <b>Doentes (157)</b>                              | 36,31 ± 3,84  | 49,68 ± 3,99   | 14,01 ± 2,77   | 61,15 ± 2,75 | 38,85 ± 2,75 |
| Multibacilares (107)                              | 37,38 ± 4,67  | 44,86 ± 4,81   | 17,76 ± 3,69   | 59,81 ± 3,35 | 40,19 ± 3,35 |
| Paucibacilares (50)                               | 34,00 ± 6,70  | 60,00 ± 6,93   | 6,00 ± 3,36    | 64,00 ± 4,80 | 36,00 ± 4,80 |
| <b>Controles (146)</b>                            | 33,56 ± 3,91  | 52,74 ± 4,13   | 13,70 ± 2,85   | 59,93 ± 2,87 | 40,07 ± 2,87 |
| <b>rs1126680 (-116G&gt;A)</b>                     |               |                |                |              |              |
|   | <i>GG</i> (%) | <i>GA</i> (%)  | <i>AA</i> (%)  | <i>G</i> (%) | <i>A</i> (%) |
| <b>Doentes (163)</b>                              | 86,50 ± 2,68  | 13,50 ± 2,68   | 0,00 ± 0,00    | 93,25 ± 1,41 | 6,75 ± 1,41  |
| Multibacilares (113)                              | 87,61 ± 3,10  | 12,39 ± 3,10   | 0,00 ± 0,00    | 93,81 ± 1,58 | 6,19 ± 1,58  |
| Paucibacilares (50)                               | 84,00 ± 5,18  | 16,00 ± 5,18   | 0,00 ± 0,00    | 92,00 ± 2,71 | 8,00 ± 2,71  |
| <b>Controles (142)</b>                            | 86,49 ± 2,87  | 12,16 ± 2,74   | 1,35 ± 0,97    | 92,57 ± 1,58 | 7,43 ± 1,58  |
| <b>rs1799807 (D70G)</b>                           |               |                |                |              |              |
|   | <i>AA</i> (%) | <i>AG</i> (%)  | <i>AA</i> (%)  | <i>A</i> (%) | <i>G</i> (%) |
| <b>Doentes (165)</b>                              | 92,12 ± 2,10  | 7,88 ± 2,10    | 0,00 ± 0,00    | 96,06 ± 1,01 | 3,94 ± 1,01  |
| Multibacilares (114)                              | 92,11 ± 2,52  | 7,89 ± 2,52    | 0,00 ± 0,00    | 96,05 ± 1,30 | 3,95 ± 1,30  |
| Paucibacilares (51)                               | 92,16 ± 3,76  | 7,84 ± 3,76    | 0,00 ± 0,00    | 96,08 ± 1,94 | 3,92 ± 1,94  |
| <b>Controles (150)</b>                            | 98,67 ± 0,94  | 1,33 ± 0,94    | 0,00 ± 0,00    | 99,33 ± 0,57 | 0,67 ± 0,57  |
| <b>rs1803274 (A539T)</b>                          |               |                |                |              |              |
|   | <i>GG</i> (%) | <i>G A</i> (%) | <i>AA</i> (%)  | <i>G</i> (%) | <i>A</i> (%) |
| <b>Doentes (163)</b>                              | 67,48 ± 3,67  | 29,45 ± 3,57   | 3,07 ± 1,35    | 82,21 ± 2,13 | 17,79 ± 2,13 |
| Multibacilares (113)                              | 66,37 ± 4,44  | 31,86 ± 4,38   | 1,77 ± 1,24    | 82,30 ± 2,56 | 17,70 ± 2,56 |
| Paucibacilares (50)                               | 70,00 ± 6,48  | 24,00 ± 6,04   | 6,00 ± 3,36    | 82,00 ± 3,84 | 18,00 ± 3,84 |
| <b>Controles (149)</b>                            | 68,45 ± 3,81  | 28,86 ± 3,71   | 2,68 ± 1,32    | 82,89 ± 2,18 | 17,11 ± 2,18 |
| <b>rs4387996 (a jusante do gene <i>BCHE</i>)</b>  |               |                |                |              |              |
| Amostras (N)                                      | <i>GG</i> (%) | <i>GA</i> (%)  | <i>A A</i> (%) | <i>G</i> (%) | <i>A</i> (%) |
| <b>Doentes (162)</b>                              | 47,53 ± 3,92  | 45,06 ± 3,90   | 7,41 ± 2,06    | 70,06 ± 2,55 | 29,94 ± 2,55 |
| Multibacilares (112)                              | 47,32 ± 4,71  | 44,64 ± 4,70   | 8,04 ± 2,57    | 69,64 ± 3,06 | 30,36 ± 3,06 |
| Paucibacilares (50)                               | 48,00 ± 7,07  | 46,00 ± 7,05   | 6,00 ± 3,36    | 71,00 ± 4,54 | 29,00 ± 4,54 |
| <b>Controles (148)</b>                            | 37,16 ± 3,97  | 48,65 ± 4,11   | 14,19 ± 2,86   | 61,49 ± 2,83 | 38,51 ± 2,83 |

Considerando as distribuições da tabela, foi feito o cálculo para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apenas a distribuição genotípica do grupo paucibacilar, para um dos SNPs a montante do gene (rs4440084), não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2_{(1)} = 4,563$ ;  $p < 5\%$ ). Esse SNP, entretanto, não mostra diferença estatisticamente significativa de frequência alélica ou genotípica, quando comparado com os demais grupos, conforme pode ser visto na tabela 12.

**Tabela 11:** Valores de Hardy-Weinberg para os seis SNPs estudados, considerando-se os grupos: multibacilares, paucibacilares, doentes e controles.

| SNPs                           | Multibacilares                      | Paucibacilares                                | Doentes                             | Controles                                    |
|--------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--|
| rs2863381                      | $\chi^2_{(1)} = 1,661$ ; $p > 10\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,020$ ; $p > 75\%$           | $\chi^2_{(1)} = 0,966$ ; $p > 25\%$ | $\chi^2_{(1)} = 3,577$ ;<br>$5\% < p < 10\%$ |
| rs4440084                      | $\chi^2_{(1)} = 0,478$ ; $p > 25\%$ | $\chi^2_{(1)} = 4,563$ ;<br>$2,5\% < p < 5\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,326$ ; $p > 50\%$ | $\chi^2_{(1)} = 1,406$ ; $p > 10\%$          |
| rs1126680<br>( <i>G-116A</i> ) | $\chi^2_{(1)} = 0,493$ ; $p > 25\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,378$ ; $p > 50\%$           | $\chi^2_{(1)} = 0,854$ ; $p > 25\%$ | $\chi^2_{(1)} = 1,996$ ; $p > 10\%$          |
| rs1799807<br>( <i>D70G</i> )   | $\chi^2_{(1)} = 0,196$ ; $p > 50\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,085$ ; $p > 25\%$           | $\chi^2_{(1)} = 0,277$ ; $p > 50\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,007$ ; $p > 95\%$          |
| rs1803274<br>( <i>A539T</i> )  | $\chi^2_{(1)} = 0,989$ ; $p > 25\%$ | $\chi^2_{(1)} = 1,748$ ; $p > 10\%$           | $\chi^2_{(1)} = 0,007$ ; $p > 97\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,044$ ; $p > 50\%$          |
| rs4387996                      | $\chi^2_{(1)} = 0,349$ ; $p > 50\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,685$ ; $p > 25\%$           | $\chi^2_{(1)} = 0,891$ ; $p > 25\%$ | $\chi^2_{(1)} = 0,109$ ; $p > 50\%$          |

De posse dos dados das tabelas anteriores, foi possível estabelecer comparações de frequências genotípicas e alélicas entre os grupos amostrais. Estas comparações podem ser verificadas na tabela 12. Para a maior parte das comparações, foi calculado o valor do  $\chi^2$ , para o qual foi usada a correção de Yates em casos de significância e com esperado menor que cinco. O resultado do teste exato de Fisher foi sempre escolhido em relação ao do  $\chi^2$ , quando o programa Statistica o computou, o que aconteceu sempre que o tamanho amostral permitiu. Foi usado o teste uni-caudal na comparação entre doentes e controles para o rs1799807 (*70G*), visto que trabalhos anteriores indicaram associação entre esta variante e a doença; o teste bicaudal foi utilizado para a comparação entre as duas formas clínicas da doença, por não haver nenhuma hipótese inicial de associação preferencial.



**Tabela 12:** Valores de  $\chi^2$  e p para os seis SNPs estudados, comparando-se hansenianos multibacilares com paucibacilares, e o total de doentes com os controles.

| SNPs                  | Multibacilares e Paucibacilares  |                                   | Doentes e Controles              |   |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
|                       | Genótipo                         | Alelo                             | Genótipo                         | Alelo   |
| rs2863381             | $\chi^2_{(4)} = 2,206$ ; p > 50% | $\chi^2_{(1)} = 1,562$ ; p > 20%  | $\chi^2_{(4)} = 7,542$ ; p > 10% | $\chi^2_{(1)} = 3,284$ ; p > 5%                       |
| rs4440084             | $\chi^2_{(4)} = 5,041$ ; p > 20% | $\chi^2_{(1)} = 0,502$ ; p > 30%  | $\chi^2_{(4)} = 0,307$ ; p > 89% | $\chi^2_{(1)} = 0,094$ ; p > 70%                      |
| rs1126680<br>(G-116A) | $\chi^2_{(1)} = 0,387$ ; p > 50% | $\chi^2_{(1)} = 0,359$ ; p > 50%  | $\chi^2_{(4)} = 1,262$ ; p > 99% | $\chi^2_{(1)} = 0,110$ ; p > 70%                      |
| rs1799807<br>(D70G)   | p = 1,000 <sup>a</sup>           | $\chi^2_{(1)} = 0,0001$ ; p > 99% | p = 0,53% <sup>b</sup>           | $\chi^2_{\text{corrigido}(1)} = 5,900$ ;<br>p = 1,51% |
| rs1803274<br>(A539T)  | $\chi^2_{(4)} = 2,817$ ; p > 50% | $\chi^2_{(1)} = 0,004$ ; p > 90%  | $\chi^2_{(4)} = 0,060$ ; p > 99% | $\chi^2_{(1)} = 0,050$ ; p > 70%                      |
| rs4387996             | $\chi^2_{(4)} = 0,211$ ; p > 99% | $\chi^2_{(1)} = 0,061$ ; p > 80%  | $\chi^2_{(4)} = 5,507$ ; p > 20% | $\chi^2_{(1)} = 5,067$ ;<br>p = 2,44%                 |

<sup>a</sup>Teste exato de Fisher (bicaudal); <sup>b</sup>Teste exato de Fisher (uni-caudal), o valor de p para bicaudal é 0,007.

O resultado estatisticamente significativo, referente à comparação entre as frequências alélicas de controles e doentes quanto ao SNP rs4387996, perde a significância quando se consideram as seis comparações feitas (2,44% vezes 6 = 14,64%), de acordo com a correção de Bonferroni. No caso do SNP 17998807 não se usou a correção de Bonferroni, uma vez que já houve dado publicado a respeito dessa associação.

## 5.2 . CÁLCULO DE *ODDS RATIO*

Para a variante *D70G* (rs179980) foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles. Como só foram encontrados heterozigotos e não foram encontrados homozigotos mutantes, pode-se atribuir essa diferença à presença de pelo menos um alelo mutante. Os doentes e controles foram comparados em relação à distribuição genotípica, resultando no valor de *odds ratio* (OR) de 6,33 com IC de 95% (1,40 a 28,53).

Comparando-se a distribuição alélica entre pacientes e controles, também foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o SNP rs4387996, sendo que o alelo A é menos frequente em pacientes. Calculando-se o valor de OR, obtém-se 0,68 com IC de 95% (0,49 a 0,95).



### 5.3 NÚMERO E FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GENÓTIPOS DOS SEIS SNPS ESTUDADOS

Nas tabelas 13, 14 e 15, encontram-se os números e as frequências (%) dos genótipos com relação aos seis SNPs analisados para controles, hansenianos multibacilares e paucibacilares, respectivamente. Os dados estão dispostos de maneira decrescente a partir dos genótipos mais frequentes, nos três grupos amostrais. No total, 33 indivíduos (16 controles, 13 multibacilares e 4 paucibacilares) foram excluídas desta análise por não apresentarem resultados para, pelo menos, um SNP.

Na tabela 13, referente aos controles, os sete primeiros genótipos, representados por 47 indivíduos, correspondem a cerca de 50% dessa amostra. Dentre esses 47, no mínimo 4 e no máximo 16 pessoas apresentam um mesmo genótipo. É de ressaltar que 26 controles possuem genótipos exclusivos. No total dessa amostra, em média 2,85 pessoas compartilham o mesmo genótipo.

Na tabela 14, referente aos hansenianos multibacilares, os oito primeiros genótipos, representados por 48 indivíduos, correspondem a cerca de 47% dessa amostra. Dentre esses 48, no mínimo 4 e no máximo 14 pessoas apresentam um mesmo genótipo. Um total de 22 indivíduos possui genótipos exclusivos. Em média, 2,15 pessoas com a forma multibacilar compartilham o mesmo genótipo.

A tabela 15 mostra os genótipos dos hansenianos paucibacilares, sendo que os cinco primeiros genótipos, representados por 23 indivíduos, correspondem a cerca de 49% dessa amostra. Dentre esses 23, no mínimo 4 e no máximo 6 pessoas apresentam um mesmo genótipo. Um total de 19 indivíduos possuem genótipos exclusivos. Em média, 2,04 pessoas compartilham o mesmo genótipo.

A tabela 16 mostra resultados do teste exato de Fisher para comparações entre controles (C) e doentes (D) quanto aos genótipos com frequência superior a 5%, em pelo menos um desses grupos. Notam-se dois valores estatisticamente significativos nessa tabela ( $p = 2,79$  e  $p = 1,24\%$ ). Aplicando-se a correção de Bonferroni, levando-se em conta que foram feitas nove comparações, esses valores de  $p$  deixam de ser  $< 5\%$  (25,11% e 11,16%, respectivamente).

**Tabela 13:** Números e frequências (%) dos genótipos dos controles, relativos a seis SNPs.

| N<br>(134) | %     | SNPs <sup>a</sup> |           |                       |                     |                      |           |
|------------|-------|-------------------|-----------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|
|            |       | rs2863381         | rs4440084 | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996 |
| 16         | 11,94 | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 12         | 8,96  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 9          | 6,77  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 9          | 6,77  | TC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 7          | 5,22  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 7          | 5,22  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 7          | 5,22  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 6          | 4,48  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 4          | 2,99  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 4          | 2,99  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 4          | 2,99  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 3          | 2,24  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 3          | 2,24  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 3          | 2,24  | TC                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 2          | 1,49  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 2          | 1,49  | TT                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 2          | 1,49  | TC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 2          | 1,49  | TC                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 2          | 1,49  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | AA        |
| 2          | 1,49  | CC                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 2          | 1,49  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | AA                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | AA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GG                    | AG                  | AA                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GC        | GA                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | AA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,75  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | AA        |
| 1          | 0,75  | TT                | GC        | GA                    | AA                  | AA                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | CC        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TT                | CC        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1          | 0,75  | CC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 1          | 0,75  | CC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | CC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1          | 0,75  | CC                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,75  | CC                | CC        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1          | 0,75  | TC                | GG        | GG                    | AG                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | TC                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,75  | TC                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | AA        |
| 1          | 0,75  | TC                | GG        | AA                    | AA                  | AA                   | AA        |
| 1          | 0,75  | CC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,75  | CC                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasoídes, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G), rs4387996 (G).

**Tabela 14:** Números e frequências (%) dos genótipos de hansenianos multibacilares, relativos a seis SNPs.

| N<br>(103) | %     | SNPs <sup>a</sup> |           |                       |                     |                      |           |
|------------|-------|-------------------|-----------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|
|            |       | rs2863381         | rs4440084 | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996 |
| 14         | 13,59 | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 6          | 5,83  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 6          | 5,83  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 5          | 4,85  | TT                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 5          | 4,85  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 4          | 3,88  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 4          | 3,88  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 4          | 3,88  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 3          | 2,91  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 3          | 2,91  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 3          | 2,91  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 3          | 2,91  | TT                | GC        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 3          | 2,91  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 2          | 1,94  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 2          | 1,94  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 2          | 1,94  | TT                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 2          | 1,94  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 2          | 1,94  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 2          | 1,94  | TC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 2          | 1,94  | TC                | CC        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 2          | 1,94  | CC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 2          | 1,94  | TC                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1          | 0,97  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1          | 0,97  | TT                | GG        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TT                | GC        | GG                    | AG                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,97  | TT                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TT                | GC        | GG                    | AG                  | AA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TT                | CC        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,97  | TC                | GC        | GA                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,97  | TC                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | CC        | AA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | CC        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | CC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1          | 0,97  | CC                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | CC                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | GG        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | TC                | GG        | GA                    | AG                  | AA                   | GA        |
| 1          | 0,97  | CC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1          | 0,97  | CC                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1          | 0,97  | CC                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasóides, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).

**Tabela 15:** Números e frequências (%) dos genótipos dos hansenianos paucibacilares, relativos a seis SNPs.

| N<br>(47) | %     | SNPs <sup>a</sup> |           |                       |                     |                      |           |
|-----------|-------|-------------------|-----------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|
|           |       | rs2863381         | rs4440084 | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996 |
| 6         | 12,76 | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 5         | 10,64 | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 4         | 8,51  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 4         | 8,51  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 4         | 8,51  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 3         | 6,38  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 2         | 4,25  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1         | 2,18  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1         | 2,18  | TT                | GG        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1         | 2,18  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TT                | GG        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1         | 2,18  | TT                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | AA        |
| 1         | 2,18  | TT                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1         | 2,18  | TT                | GC        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | GA                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TT                | GC        | GG                    | AA                  | AA                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TC                | CC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1         | 2,18  | TC                | GC        | GG                    | AG                  | GA                   | GG        |
| 1         | 2,18  | TC                | GC        | GA                    | AG                  | AA                   | GA        |
| 1         | 2,18  | CC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GG        |
| 1         | 2,18  | CC                | GC        | GG                    | AA                  | GG                   | GA        |
| 1         | 2,18  | CC                | GC        | GA                    | AA                  | GA                   | AA        |
| 1         | 2,18  | TC                | GG        | GG                    | AA                  | GA                   | GA        |
| 1         | 2,18  | CC                | GC        | GA                    | AA                  | AA                   | GA        |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasoídes, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).

**Tabela 16:** Comparações entre controles (C) e doentes (D) em relação aos genótipos com frequência superior a 5% em pelo menos um desses grupos. Os valores de p encontram-se em porcentagem.

| SNPs      |           |           |           |           |           | C     | D     | Teste exato de Fisher bicaudal |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|--------------------------------|
| rs2863381 | rs4440084 | rs1126680 | rs1799807 | rs1803274 | rs4387996 |       |       |                                |
|           |           | (G-116A)  | (D70G)    | (A539T)   |           | %     | %     | (p%)                           |
| <i>TC</i> | <i>GC</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GA</i> | 11,94 | 7,33  | p = 22,55                      |
| <i>TT</i> | <i>GC</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GA</i> | 8,86  | 6,00  | p = 37,14                      |
| <i>TC</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | 6,77  | 3,33  | p = 27,24                      |
| <i>TC</i> | <i>CC</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GA</i> | 6,77  | 1,33  | p = 2,79                       |
| <i>TT</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | 5,22  | 4,66  | p = 100,00                     |
| <i>TT</i> | <i>GC</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | 5,22  | 2,00  | p = 19,91                      |
| <i>TC</i> | <i>GC</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | 5,22  | 1,33  | p = 8,91                       |
| <i>TT</i> | <i>GC</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | 4,47  | 13,33 | p = 1,24                       |
| <i>TC</i> | <i>GG</i> | <i>GG</i> | <i>AA</i> | <i>GG</i> | <i>GA</i> | 1,49  | 5,33  | p = 10,88                      |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasóides, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).

### 5.3.1 Genótipos dos seis SNPs apenas para os doentes heterozigotos para rs1799807 (D70G)

Considerando que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao aumento de frequência do alelo 70G em doentes, a tabela 17 mostra apenas os doentes heterozigotos, multi e paucibacilares, para esta variante, com os outros genótipos para todos os demais SNPs.

**Tabela 17:** Genótipos dos SNPs de pacientes multibacilares (M) e paucibacilares (P) que são heterozigotos para rs1799807 (*D70G*).

| N<br>(13) | %     | SNPs <sup>a</sup> |           |                                |                              |                               |           |
|-----------|-------|-------------------|-----------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------|
|           |       | rs2863381         | rs4440084 | rs1126680<br>( <i>G-116A</i> ) | Rs1799807<br>( <i>D70G</i> ) | rs1803274<br>( <i>A539T</i> ) | rs4387996 |
| 3 M E 1 P | 30,77 | <i>TT</i>         | <i>GC</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TT</i>         | <i>GG</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TT</i>         | <i>GC</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GG</i>                     | <i>GA</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TT</i>         | <i>GC</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>AA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TT</i>         | <i>CC</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TC</i>         | <i>CC</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TC</i>         | <i>GG</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 M       | 7,69  | <i>TC</i>         | <i>GG</i> | <i>GA</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>AA</i>                     | <i>GA</i> |
| 1P        | 7,69  | <i>TC</i>         | <i>GC</i> | <i>GG</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>GA</i>                     | <i>GG</i> |
| 1 P       | 7,69  | <i>TC</i>         | <i>GC</i> | <i>GA</i>                      | <i>AG</i>                    | <i>AA</i>                     | <i>GA</i> |

<sup>a</sup>Alelos mais freqüentes em caucasoídes, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).

#### 5.4 DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DOS SEIS SNPS ESTUDADOS

Com auxílio do programa Arlequin (EXCOFFIER e cols., 2005), foram calculadas as distribuições de frequência dos haplótipos em todos os grupos amostrais (tabelas 18, 19, 20 e 21). Nos paucibacilares (tabela 19), foram calculadas as distribuições com apenas cinco SNPs, pois o SNP rs4440084 não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não pôde ter suas distribuições haplotípicas calculadas, conforme condição estabelecida pela metodologia. Nas tabelas 20 e 21, os haplotipos com o alelo *70G* estão evidenciados em negrito.

A comparação entre multi e paucibacilares (tabelas 18 e 19), feita também desconsiderando o rs4440084, mostra que os quatro haplótipos mais freqüentes são coincidentes, mas apenas o mais freqüente tem posição coincidente (43,49% nos multi e 50,59% nos pauci). Nos multibacilares, o segundo lugar (18,09%) é o terceiro nos paucibacilares (11,37%). O segundo lugar dos pauci (11,81) é o quarto lugar (7,72%) dos multibacilares; o terceiro lugar dos multibacilares (9,23%) é o quarto dos paucibacilares (9,20%).

A tabela 22 mostra resultados de comparações entre controles e doentes nos casos de haplótipos com frequência superior a 5%, em pelo menos um desses grupos.

Entre doentes e controles (tabelas 20, 21 e 22), os três haplótipos mais freqüentes são os mesmos, mas apenas a primeira posição é coincidente, visto que o segundo lugar dos doentes é o terceiro dos controles e vice-versa. Esses três haplótipos correspondem a 57,37% do grupo dos doentes e 48,41% do grupo dos controles. Há semelhança entre as freqüências desses haplótipos nesses grupos amostrais (Tabela 22).

Entretanto, na tabela 22, podem-se observar três valores de  $p$  estatisticamente significativos. Quando se aplica a correção de Bonferroni, a diferença de freqüência de apenas um desses haplótipos [T; C; G; A; G; A] continua significativa (de  $p = 0,33\%$  passa para  $p = 2,31\%$ ). Das demais comparações, uma ( $p = 0,97\%$ ) fica próxima da significância ( $p = 6,79\%$ ). O valor de OR, quando se considera o haplótipo [T; C; G; A; G; A], é 0,34 ( $IC_{(95\%)}$  de 0,16 a 0,72), indicando um efeito protetor, em relação à hanseníase, cerca de 3 vezes maior do que os demais haplótipos.

Comparando-se doentes e controles, tendo como critério a presença destes dois SNPs que estão no haplótipo com caráter protetor (variantes alélicas C, rs4440084, e A, rs4387996), verifica-se que, nos doentes, estas variantes alélicas aparecem em 10,92% dos haplótipos, ao passo que nos controles, aparecem em 18,86% dos haplótipos. Isto corresponde a uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $\chi^2_{(1)} = 8,93$ ;  $p = 0,28\%$ ). O valor de OR para essa comparação é de 0,49 ( $IC_{(95\%)}$  0,30 – 0,79), novamente indicando um efeito protetor contra o mal de Hansen cerca de 2 vezes maior que os demais haplótipos com as outras variantes para esses dois SNPs.

**Tabela 18:** Distribuição de frequência dos 22 haplótipos dos seis SNPs estudados em doentes multibacilares.

| Frequência (%)     | Desvio padrão (%) | SNPs <sup>a</sup> |           |                       |                     |                      |           |
|--------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|
|                    |                   | rs2863381         | rs4440084 | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996 |
| 33,91              | 5,43              | T                 | G         | G                     | A                   | G                    | G         |
| 15,33              | 4,21              | T                 | C         | G                     | A                   | G                    | G         |
| 8,35               | 3,10              | T                 | G         | G                     | A                   | G                    | A         |
| 8,05               | 4,09              | C                 | G         | G                     | A                   | G                    | G         |
| 6,90               | 4,11              | C                 | C         | G                     | A                   | G                    | A         |
| 4,62               | 2,63              | C                 | G         | G                     | A                   | G                    | A         |
| 3,94               | 2,41              | T                 | C         | G                     | A                   | G                    | A         |
| 2,98               | 2,13              | C                 | G         | A                     | A                   | A                    | A         |
| 2,33               | 1,87              | T                 | C         | G                     | G                   | A                    | G         |
| 2,11               | 1,69              | T                 | C         | G                     | A                   | A                    | G         |
| 2,03               | 2,18              | T                 | G         | A                     | A                   | A                    | A         |
| 1,90               | 2,38              | T                 | G         | G                     | A                   | A                    | G         |
| 1,88               | 1,92              | C                 | C         | G                     | A                   | G                    | G         |
| 1,68               | 1,44              | C                 | G         | G                     | A                   | A                    | A         |
| 1,41               | 0,96              | C                 | C         | G                     | A                   | A                    | G         |
| 1,37               | 1,26              | T                 | G         | A                     | A                   | A                    | G         |
| 0,86               | 1,09              | C                 | C         | G                     | A                   | A                    | G         |
| 0,35               | 0,25              | C                 | C         | G                     | A                   | A                    | A         |
| 1x10 <sup>-4</sup> | 0,44              | T                 | C         | A                     | A                   | A                    | A         |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasóides, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).

**Tabela 19:** Distribuição de frequência dos haplótipos dos cinco SNPs, com distribuição genotípica em equilíbrio de Hardy-Weinberg, estudados em doentes paucibacilares.

| Frequência (%) | Desvio padrão (%) | SNPs <sup>a</sup> |                       |                     |                      |           |
|----------------|-------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|
|                |                   | rs2863381         | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996 |
| 50,59          | 6,01              | T                 | G                     | A                   | G                    | G         |
| 11,81          | 5,04              | C                 | G                     | A                   | G                    | A         |
| 11,37          | 2,19              | T                 | G                     | A                   | G                    | A         |
| 9,20           | 2,85              | C                 | G                     | A                   | G                    | G         |
| 3,82           | 2,20              | T                 | G                     | A                   | A                    | G         |
| 3,63           | 1,89              | C                 | G                     | A                   | A                    | A         |
| 2,59           | 1,70              | T                 | A                     | A                   | A                    | A         |
| 1,62           | 1,54              | T                 | G                     | G                   | A                    | G         |
| 1,57           | 1,45              | C                 | G                     | G                   | A                    | G         |
| 1,46           | 1,37              | C                 | A                     | A                   | A                    | A         |
| 1,28           | 1,78              | T                 | A                     | A                   | A                    | G         |
| 1,06           | 1,31              | C                 | A                     | A                   | A                    | G         |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasóides, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).



**Tabela 20:** Distribuição de frequência dos haplótipos dos seis SNPs estudados em todo o grupo dos doentes.

| Frequência (%) | Desvio padrão (%) | SNPs <sup>a</sup> |                 |                       |                     |                      |                 |
|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
|                |                   | rs2863381         | rs4440084       | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996       |
| 25,07          | 2,73              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 18,49          | 3,24              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 13,81          | 1,94              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 6,49           | 1,17              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 6,47           | 1,92              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 4,55           | 1,87              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 3,79           | 1,61              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 3,43           | 1,59              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 2,40           | 1,48              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 2,36           | 1,13              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| <b>2,35</b>    | <b>0,87</b>       | <b><i>T</i></b>   | <b><i>C</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>A</i></b>      | <b><i>G</i></b> |
| 1,57           | 2,17              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 1,56           | 0,60              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| <b>1,46</b>    | <b>0,66</b>       | <b><i>T</i></b>   | <b><i>G</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>A</i></b>      | <b><i>G</i></b> |
| 1,13           | 0,96              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 1,04           | 0,53              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 0,75           | 0,44              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 0,69           | 0,58              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 0,63           | 0,63              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 0,53           | 0,60              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 0,52           | 0,68              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 0,37           | 0,59              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| <b>0,33</b>    | <b>0,27</b>       | <b><i>T</i></b>   | <b><i>C</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>G</i></b>      | <b><i>A</i></b> |
| <b>0,13</b>    | <b>0,30</b>       | <b><i>C</i></b>   | <b><i>G</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>A</i></b>      | <b><i>G</i></b> |
| <b>0,07</b>    | <b>0,84</b>       | <b><i>C</i></b>   | <b><i>C</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>A</i></b>      | <b><i>G</i></b> |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasoídes, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G). Em negrito estão os haplótipos com D70G.

**Tabela 21:** Distribuição de frequência dos haplótipos dos seis SNPs estudados em todo o grupo dos controles.

| Frequência (%)        | Desvio padrão (%) | SNPs <sup>a</sup> |                 |                       |                     |                      |                 |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
|                       |                   | rs2863381         | rs4440084       | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996       |
| 24,89                 | 3,92              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 11,95                 | 3,43              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 11,57                 | 1,81              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 9,47                  | 3,83              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 8,86                  | 3,23              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 8,09                  | 1,68              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 7,12                  | 2,55              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>        |
| 4,78                  | 1,69              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 2,40                  | 1,17              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 2,01                  | 1,11              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 1,54                  | 0,93              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 1,34                  | 1,27              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 1,00                  | 0,92              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 0,88                  | 0,67              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 0,83                  | 0,57              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |
| 0,76                  | 0,45              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 0,66                  | 0,82              | <i>C</i>          | <i>C</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>A</i>        |
| 0,56                  | 0,93              | <i>T</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| 0,54                  | 0,46              | <i>C</i>          | <i>G</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>A</i>             | <i>G</i>        |
| <b>0,37</b>           | <b>0,29</b>       | <b><i>T</i></b>   | <b><i>G</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>A</i></b>      | <b><i>A</i></b> |
| <b>0,37</b>           | <b>0,32</b>       | <b><i>C</i></b>   | <b><i>G</i></b> | <b><i>G</i></b>       | <b><i>G</i></b>     | <b><i>G</i></b>      | <b><i>A</i></b> |
| <1 x 10 <sup>-4</sup> | 0,27              | <i>T</i>          | <i>C</i>        | <i>A</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>        |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucásios, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G). Em negrito estão os haplótipos com D70G.

**Tabela 22:** Comparações entre controles (C) e doentes (D) em relação aos haplótipos com frequência superior a 5% em pelo menos um desses grupos. Os valores de p encontram-se em porcentagem.

| SNPs      |           |                       |                     |                      |           | C     | D     | $\chi^2$                                |
|-----------|-----------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|-------|-------|---|
| rs2863381 | rs4440084 | rs1126680<br>(G-116A) | rs1799807<br>(D70G) | rs1803274<br>(A539T) | rs4387996 | %     | %     | (p%)                                    |
| <i>T</i>  | <i>G</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>  | 24,89 | 25,07 | $\chi^2_{(1)} < 10^{-3}$ ;<br>p = 98,16 |
| <i>T</i>  | <i>G</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>  | 11,95 | 13,82 | $\chi^2_{(1)} = 5,28$ ;<br>p = 2,16     |
| <i>T</i>  | <i>C</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>  | 11,57 | 18,49 | $\chi^2_{(1)} = 0,44$ ;<br>p = 50,94    |
| <i>T</i>  | <i>C</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>  | 9,47  | 3,43  | $\chi^2_{(1)} = 8,62$ ;<br>p = 0,33     |
| <i>C</i>  | <i>C</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>  | 8,86  | 3,79  | $\chi^2_{(1)} = 6,69$<br>p = 0,97       |
| <i>C</i>  | <i>C</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>A</i>  | 8,09  | 6,47  | $\chi^2_{(1)} = 0,69$<br>p = 40,72      |
| <i>C</i>  | <i>G</i>  | <i>G</i>              | <i>A</i>            | <i>G</i>             | <i>G</i>  | 7,12  | 6,49  | $\chi^2_{(1)} = 0,11$<br>p = 74,29      |

<sup>a</sup>Alelos mais frequentes em caucasoídes, segundo o HapMap: rs2863381 (T), rs4440084 (G), rs1126680 (G), rs1799807 (A), rs1803274 (G) e rs4387996 (G).

Para os cálculos de desequilíbrio de ligação, foram utilizados os valores de D'e r<sup>2</sup> também fornecidos pelo programa Arlequin (EXCOFFIER e cols., 2005). Em caso de valores significativos para o desequilíbrio, estão sendo mostrados os valores de p (%) (tabelas 21 e 22).

**Tabela 23:** Valores referentes ao desequilíbrio de ligação no grupo de doentes entre os seis SNPs:  $D'$ (%),  $r^2$ (%) e, em caso de significância do  $\chi^2$ ,  $p$  (%).

| SNPs                  |  |   |   |   |   |                     |
|-----------------------|--|---|---|---|---|---------------------|
| $D'$ (%)<br>$r^2$ (%) | rs2863381                                | rs4440084                               | rs1126680<br>(G-116A)                     | rs1799807<br>(D70G)                       | rs1803274<br>(A539T)                    | rs4387996           |
| rs2863381             | *  | 16,83<br>$p = 3,86$                     | 30,55<br>$p = 1,10$                       | 100,00<br>$p = 4,35$                      | 2,30                                    | 22,13<br>$p = 0,08$ |
| rs4440084             | 1,44<br>$\chi^2 = 4,28$<br>$p = 3,86$    | *                                       | 51,23                                     | 45,30<br>$p = 4,54$                       | 19,15                                   | 6,90                |
| rs1126680<br>(G-116A) | 2,18<br>$\chi^2 = 6,47$<br>$p = 1,10$    | 1,28                                    | *   | 100,00                                    | 88,21<br>$p < 0,01$                     | 5,26                |
| rs1799807<br>(D70G)   | 1,37<br>$\chi^2 = 4,08$<br>$p = 4,35$    | 1,35<br>$\chi^2 = 4,00$ ;<br>$p = 4,54$ | 0,32                                      | *   | 89,69<br>$p < 0,01$                     | 71,88               |
| rs1803274<br>(A539T)  | 0,04                                     | 0,56                                    | 24,93<br>$\chi^2 = 74,04$ ;<br>$p < 0,01$ | 14,26<br>$\chi^2 = 42,35$ ;<br>$p < 0,01$ | *                                       | 40,79<br>$p = 2,62$ |
| rs4387996             | 3,79<br>$\chi^2 = 11,26$ ;<br>$p = 0,08$ | 0,13                                    | 0,05                                      | 0,92                                      | 1,66<br>$\chi^2 = 4,94$ ;<br>$p = 2,62$ | *                   |

**Tabela 24:** Valores referentes ao desequilíbrio de ligação no grupo de controles entre os seis SNPs:  $D'$ (%),  $r^2$  (%) e, em caso de significância do  $\chi^2$ ,  $p$  (%).

| SNPs                           |                                      |                                       |   |                              |                               |                     |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| $D'$ (%)<br>$r^2$ (%)          | rs2863381                            | rs4440084                             | rs1126680<br>( <i>G-116A</i> )          | rs1799807<br>( <i>D70G</i> ) | rs1803274<br>( <i>A539T</i> ) | rs4387996           |
| rs2863381                      | *                                    | 30,55<br>$p = 0,01$                   | 24,17                                   | 27,96                        | 4,34                          | 3,99                |
| rs4440084                      | 6,10<br>$\chi^2=16,34$<br>$p = 0,01$ | *                                     | 47,76                                   | 100,00                       | 63,69<br>$p = 0,03$           | 14,70<br>$p = 1,61$ |
| rs1126680<br>( <i>G-116A</i> ) | 1,01                                 | 1,17                                  | *                                       | 100,00                       | 87,57<br>$p < 0,01$           | 73,55<br>$p = 0,01$ |
| rs1799807<br>( <i>D70G</i> )   | 0,13                                 | 0,51                                  | 0,06                                    | *                            | 40,97                         | 100,00              |
| rs1803274<br>( <i>A539T</i> )  | 0,02                                 | 4,94<br>$\chi^2=13,25$<br>$p = 0,03$  | 32,40<br>$\chi^2 = 86,82$<br>$p < 0,01$ | 0,70                         | *                             | 22,38               |
| rs4387996                      | 0,10                                 | 2,16<br>$\chi^2 = 5,79$<br>$p = 1,61$ | 6,12<br>$\chi^2 = 16,39$<br>$p = 0,01$  | 1,11                         | 1,34                          | *                   |

## 6. DISCUSSÃO

Os grupos de pacientes e de controles estudados diferem estatisticamente quanto à distribuição de sexo ( $\chi^2_{(1)} = 5,20$ ;  $p < 0,05$ ), sendo que o sexo masculino é mais frequente nos pacientes (57%) do que nos controles (45%). Como o sexo não foi critério de exclusão e não há relatos de que a hanseníase esteja relacionada preferencialmente a um dos sexos, este resultado não invalida as análises feitas.

A distribuição étnica do presente estudo (tabelas 6 e 9) reflete aproximadamente a da população do Paraná, tanto nos doentes ( $\chi^2_{(4)} = 1,85$ ;  $p > 50\%$ ) quanto nos controles ( $\chi^2_{(4)} = 1,39$ ;  $p > 50\%$ ), que conta com 73,1% de brancos, 23,0% de pardos, 2,60% de negros e 1,2% de asiáticos e/ou indígenas, segundo dados indicadores sociais do IBGE (2007). Muito embora todos os controles tenham vindo da cidade de Piraquara, não foram averiguados indivíduos consanguíneos. Como já foi citado, boa parte da amostra de controles é composta de funcionários do Hospital São Roque, mas muitos deles não residem em Piraquara, sendo moradores de Curitiba e de outros municípios da região metropolitana. Além disso, a maioria dos controles não compartilha o sobrenome e, os que compartilham, possuem sobrenomes relativamente comuns, como de Souza (4 pessoas – 2,67%), da Silva (4 pessoas – 2,67%) e de Jesus (3 pessoas – 2,00%).

A idade média dos 165 pacientes foi  $55,24 \pm 1,37$  anos e a dos 150 controles foi  $46,06 \pm 1,18$  anos. Há diferença significativa entre as médias de idade ( $t = 5,10$ ;  $p = 5,72 \times 10^{-5}$ ), tendo o grupo de pacientes, média mais elevada. Esta diferença também não altera ou tampouco invalida os resultados, pois a divergência na idade entre os grupos não justificaria diferença de susceptibilidade à doença ou de frequência de determinado alelo.

A amostra deste trabalho foi composta pela amostra estudada por GOMES (2007) acrescida de 81 pacientes e 64 controles, totalizando 167 pacientes e 150 controles. Entretanto, nenhum dos seis SNPs foi tipado para todos os indivíduos, em vista de problemas metodológicos (Tabela 10). Dois SNPs (rs1799807 e rs1803274) foram também genotipados pela metodologia de SSCA, além da metodologia *Taqman*, sendo que os resultados foram 100% concordantes.

Verificando as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos amostrais, não houve diferença estatisticamente significativa para a maior parte dos SNPs (tabela 12). Contudo, comparando-se pacientes e controles, foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o SNPs rs179980 (*D70G*). Neste caso, o alelo menos frequente e o heterozigoto estão aumentados no grupo dos doentes. Assim, foi calculado o valor de *odds ratio* (OR) e ao se comparar o grupo total de doentes com os controles, obteve-se OR de 6,33 com IC de 95% (1,40

a 28,53) para os heterozigotos *70DG* em comparação com os homozigotos *70DD*. Isso significa que o heterozigoto para a variante atípica da BChE tem uma probabilidade cerca de 6 vezes maior de desenvolver o mal de Hansen do que os homozigotos para o alelo mais freqüente.

Confrontando os dados dos hansenianos com os dados de uma amostra de 361 euro-brasileiros doadores de sangue da população de Curitiba (MIKAMI e cols., 2008), verificam-se diferenças estatisticamente significativas:  $\chi^2_{(1)} = 4,45$ ;  $p < 5\%$ , quanto à comparação entre as distribuições genótípicas, e  $\chi^2_{(1)} = 4,36$ ;  $p < 5\%$  quanto à comparação entre as frequências alélicas. Os dados de MIKAMI e cols. (2008) se referem a 13 heterozigotos (3,60%), com frequência de 1,8% da variante *70G*. Vale dizer que, embora a amostra de MIKAMI e cols. (2008) seja composta apenas de euro-brasileiros, ainda é um controle apropriado para essa comparação, pois 84,6% das variantes atípicas da presente amostra foram encontradas em indivíduos de etnia euro-brasileira. Além disso, não há evidências de que o mal de Hansen afete preferencialmente uma determinada etnia e a variante atípica é mais freqüente em euro-brasileiros, sendo que sua ocorrência em afro-brasileiros foi considerada como devida à miscigenação desse grupo étnico com europeus (CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1984). Dessa forma, não se esperaria que a variante atípica estivesse com frequência relativamente diminuída nesta amostra de MIKAMI e cols. (2008), o que a torna um controle com um bom grau de rigor.

Comparando-se a distribuição de genótipos usuais e heterozigotos encontrados no presente estudo, com os de MIKAMI e cols. (2008) foi encontrado um valor de OR significativo de 2,29 (IC<sub>(95%)</sub> de 1,04 a 5,05), significando que a heterozigose aumenta cerca de duas vezes o risco de contração do mal de Hansen. Como essa amostra populacional é de tamanho maior que a amostra controle do presente estudo, é possível que o valor de 6,33 do OR calculado anteriormente possa ser uma superestimativa, sendo que o valor real possa estar entre 2 e 6. É preciso considerar, entretanto, que a amostra de MIKAMI e cols. (2008) não levou em consideração, como a presente amostra de controles, a ausência da hanseníase com o contato com doentes para composição de sua amostra, representando apenas uma comparação populacional.

O genótipo mais freqüente (11,94%) nos controles (tabela 13) corresponde ao que seria esperado como mais freqüente, segundo os dados do HapMap: os SNPs adjacentes ao gene estão todos em heterozigose e todos os internos ao gene estão em homozigose para o alelo de maior frequência na população caucasóide [ *TC*; *GC*; *GG*; *AA*; *GG*; *GA*;]. O mesmo não ocorreu com os doentes. Em ambos os grupos, multi e paucibacilares, o genótipo mais freqüente (13,59% e 12,76, respectivamente) é igual quanto a quatro SNPs ao mais freqüente dos controles, mas têm

o SNP rs2863381 (a montante) e o SNP rs4387996 (a jusante) em homozigose para o alelo mais freqüente para a população caucasóide.

A tabela 17 mostra apenas os genótipos dos doentes que apresentam o alelo 70G (SNP rs179980), que é significativamente mais freqüente em doentes do que em controles. Dos quatro doentes com genótipo equivalente [TT; GC; GG; AG; GA; GG], os três multibacilares foram obtidos de Curitiba e região metropolitana e possuem sobrenomes diferentes, ao passo que o paucibacilar foi obtido em São Jerônimo. Esses dados diminuem bastante a chance desses doentes serem consangüíneos, podendo sugerir que esse seja um genótipo de maior risco.

Além do maior risco encontrado para o heterozigoto 70DG, a tabela 22 mostra que o haplótipo [T; C; G; A; G; A] está associado com proteção à doença (OR= 0,34; IC<sub>(95%)</sub> de 0,16 a 0,72), apresentando risco cerca de 3 vezes menor em contraí-la. Este haplótipo é o quarto mais freqüente em controles (9,47%) e o oitavo em pacientes (3,43%). Esse haplótipo difere do mais frequente [T; G; G; A; G; G], que ocorre em 24,89% dos controles e 25,07% dos pacientes, em dois SNPs (rs4440084 e rs4387996) fora do gene *BCHE*. É interessante ressaltar que o SNP rs4387996, antes da correção de Bonferroni, mostrou diferença significativa na distribuição da freqüência alélica entre controles e doentes, sendo o alelo A mais freqüente nos controles. Esses dois SNPs estão em desequilíbrio de ligação apenas em controles (tabela 23), sendo que a variante C está preferencialmente com a A. Esse fato pode reforçar o papel conjunto dessas variantes na proteção à hanseníase, junto com as demais quatro estudadas e que são as mais freqüentes na população.

Sugere-se que esses dois SNPs não tenham relação causal com a proteção, uma vez que são de regiões intergênicas. A hipótese é que esses dois SNPs possam estar em desequilíbrio de ligação com variante de um gene que esteja associada com proteção à hanseníase. Consultando-se o programa SNPBrowser (DE LA VEGA e cols., 2006), observou-se que o próximo gene (*SLITRK3*), à jusante do gene *BCHE* e distante 650 Mb, está dentro do mesmo bloco de desequilíbrio de ligação em caucasóides. A proteína Slitrk3, pertence a uma família de proteínas transmembrânicas neuronais (Slitrk), que atuam no controle do crescimento dos neuritos (ARUGA e MIKOSHIBA, 2003). À montante, o gene mais próximo não está no mesmo bloco de ligação com o gene *BCHE*.

Comparando-se doentes e controles, tendo como critério apenas a presença dessas variantes alélicas do haplótipo supostamente protetor, verifica-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $\chi^2_{(1)} = 8,93$ ;  $p = 0,28\%$ ). O valor de OR para essa comparação é de 0,49 (IC<sub>(95%)</sub> 0,30 – 0,79), novamente indicando um efeito protetor contra o mal de Hansen cerca de 2 vezes maior que os demais haplótipos sem ambas as variantes. Como essas variantes



estariam relacionadas a um caráter protetor, não seria esperado que estivessem no mesmo haplótipo de *70G*, tendo em vista a sugestão de que este predisporia à doença. Nos pacientes, apenas 7,6% dos heterozigotos *70DG* possuem essa combinação. Entre os demais haplótipos com *70G*, nenhum possui a variante *A* do SNP rs4387996, que é a que mostrou frequência alélica significativamente aumentada em controles antes da correção de Bonferroni (Tabela p = 2,44%, para p = 14,64%, após essa correção). Isto é uma sugestão de que essa variante *A* possa realmente estar associada indiretamente em alguma forma de proteção. Entretanto, é necessária a realização de estudo com amostra maior, mais representativa, para elucidar melhor essa relação e a possível associação funcional com o gene *SLITRK3*. Nenhum dos dois controles *70DG* apresenta as variantes *C*, *70G* e *A* em um mesmo haplótipo.

No que se refere ao desequilíbrio de ligação, para todo o grupo de doentes (tabela 22) foi encontrada significância entre os seguintes SNPs: rs4387996 e rs1803274 (*A539T*; p = 2,62%); rs1126680 (*G-116A*) e rs1803274 (p < 0,01%); rs1126680 e rs2863381 (p = 1,10%); rs1799807 (*D70G*) e rs1803274 (p = < 0,01%); rs1799807 e rs4440084 (p = 4,54%); rs4440084 e rs2863381 (p = 3,86%), rs4387996 e rs2863381 (p = 0,08%), rs1799807 e rs2863381 (p = 4,35%).

No grupo dos controles (tabela 22) foi encontrado desequilíbrio de ligação significativo entre os seguintes SNPs: rs4387996 e rs1126680 (p = 0,01%); rs4387996 e rs4440084 (p = 1,61%); rs1126680 e rs1803274 (p < 0,01%); rs1803274 e rs4440084 (p = 0,03%); rs4440084 e rs2863381 (p = 0,01%).

Observa-se que os desequilíbrios de ligação entre os SNPs não são exatamente os mesmos entre doentes e controles. Há concordância em apenas duas situações: rs4440084 e rs2863381 (ambos a montante) e rs1126680 (*G-116A*) e rs1803274 (*A539T*). Este último desequilíbrio era esperado, pois se trata de duas variantes com desequilíbrio já mostrado pela literatura (BARTELS e cols., 1990). Todavia, o desequilíbrio entre rs1799807 (*D70G*) e rs1803274 (*A539T*) também era esperado, pelo mesmo motivo, mas só foi encontrado nos doentes, possivelmente pela baixa frequência de *D70G* nos controles e tamanho amostral insuficiente.

As demais situações de diferença entre os grupos amostrais podem também ser devidas a diferenças de frequências alélicas e/ou a tamanho amostral relativamente reduzido. Os desequilíbrios de ligação que foram encontrados exclusivamente nos doentes foram nos SNPs: rs4387996 e rs1803274 (preferencialmente *A* segregando com *G* e *G* com *A*, respectivamente), rs1799807 e rs2863381 (*C* com *A* e *G* com *T*), rs4387996 e rs2863381 (*A* com *C* e *G* com *T*),

rs1126680 e rs2863381 (A com C e G com T), rs1799807 e rs4440084 (A com G e G com C) e rs1799807 e rs2863381 (A com C e G com T).

Exclusivamente nos controles (tabelas 17 e 18 mostram os haplótipos de doentes e controles, respectivamente), foi encontrado desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs4387996 e rs1126680 (preferencialmente A com G e G com C, respectivamente) e rs1803274 e rs4440084 (A com A e G com G) e rs4440084 e rs4387996 (A com C e G com G).

Os valores de  $D'$  e  $r^2$  fornecidos pelo programa Haploview com os resultados obtidos neste trabalho estão na tabela 25. A tabela mostra também a distância em pares de base (pb) entre os SNPs. Os dados de SNPs faltantes não estavam disponíveis pelo programa. Verifica-se uma grande variação quando se observam as três fontes de dados, mas observa-se que entre os dados de  $r^2$  significativos, evidenciados em negrito há, em geral, concordância de significância, pelo menos entre dados de duas fontes.

**Tabela 25:** Comparação entre os valores de  $D'$ (%) e  $r^2$  (%) obtidos para o desequilíbrio de ligação entre doentes (Do) e controles (C) com os dados obtidos do programa Haploview (H) para caucasoídes. Em negrito, valores significativos de  $r^2$ .

| SNPs                  | $D'$<br>(Do) | $D'$<br>(C) | $D'$<br>(H) | $r^2$<br>(Do) | $r^2$<br>(C) | $r^2$<br>(H) | Distância<br>(pb) |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------|---------------|--------------|--------------|-------------------|
| rs4387996 X rs1803274 | 40,79        | 22,38       | 59,20       | <b>1,66</b>   | 1,34         | 10,00        | 248836            |
| rs4387996 X rs1799807 | 71,88        | 100,00      | 100,00      | 0,92          | 1,11         | 0,30         | 306085            |
| rs4387996 X rs4440084 | 6,90         | 14,70       | 44,70       | 0,13          | <b>2,16</b>  | 6,50         | 589897            |
| rs4387996 X rs2863381 | 22,13        | 3,99        | 21,11       | <b>3,79</b>   | 0,10         | 2,30         | 822655            |
| rs1803274 X rs1799807 | 89,69        | 40,97       | 100,00      | <b>14,26</b>  | 0,70         | 4,00         | 572490            |
| rs1803274 X rs4440084 | 19,15        | 63,69       | 40,90       | 0,56          | <b>4,94</b>  | 3,33         | 341061            |
| rs1803274 X rs2863381 | 2,30         | 4,34        | 9,10        | 0,04          | 0,02         | 1,00         | 573819            |
| rs1799807 X rs4440084 | 45,30        | 100,00      | 100,00      | <b>1,35</b>   | 0,51         | 8,00         | 283812            |
| rs1799807 X rs2863381 | 100,00       | 27,96       | 100,00      | <b>1,37</b>   | 0,13         | 5,00         | 516570            |
| rs4440084 X rs2863381 | 16,83        | 30,55       | 34,00       | <b>1,44</b>   | <b>6,10</b>  | 7,20         | 232758            |

É evidente que o mal do Hansen é uma doença complexa e multifatorial. Isto significa que há uma série de fatores ambientais envolvidos, como insetos vetores e solo contaminado (EMEDICINE, 2008) e há mais de um gene influenciando na sua contração e desenvolvimento, conforme já exposto no capítulo de Revisão Bibliográfica. As variantes encontradas significativamente diferenciadas nos dois grupos, rs1799807 (*D70G*) e rs4387996, podem, de fato, exercer uma influência na susceptibilidade à doença, mas não se pode descartar a hipótese

de estarem apenas servindo como marcadores para um outro gene, com o qual estejam em desequilíbrio de ligação, e que tenha a relação funcional com a susceptibilidade à hanseníase.

O fato de *70G* (SNP rs1799807) diminuir a atividade da BChE, frente a substratos positivamente carregados, é uma sugestão de sua possível influência, pois levaria a uma menor retirada de xenobióticos e desintoxicação do organismo. Isto poderia ocorrer com alguma toxina do *M. leprae*, aumentando o risco de contração da doença. Além disso, há ainda a já citada relação com a acetilcolina (ACh), cujo excesso, causado por uma ineficiente acetilcolinesterase, diminui a resposta imune inflamatória. Nesse caso, ficaria a cargo da BChE retirar o excesso de ACh, o que também não ocorreria de forma eficiente em indivíduos com a variante atípica *70G*.

É interessante ressaltar que no estudo de MAHMOUD e cols. (2003) foi mostrado que baixos níveis de atividade da BChE estariam relacionados com uma alteração no sistema imune em mulheres grávidas com hipertensão induzida pela gravidez, que apresentaram correlações negativas entre a percentagem de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e a atividade da BChE. Segundo esses autores, um baixo nível de atividade da BChE prejudicaria a hidrólise de toxinas ambientais, aumentando o número de células do sistema imune e contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão. OLIVEIRA (2006) mostrou associação entre a variante *-116A* (rs1126680) e o aparecimento precoce de diabetes do tipo 1, doença considerada auto-imune. Em pesquisa posterior (FURTADO-ALLE e cols., 2008) ficou evidenciado que a variante *-116A* está associada com atividade mais baixa da BChE.

Esses trabalhos mostram associação entre atividade mais baixa da BChE e doenças relacionadas ao sistema imune. A relação encontrada com a BChE, no presente estudo, não está clara quanto a ser funcional ou dependente de desequilíbrio de ligação com variante de outro gene associado com a predisposição e o desenvolvimento do mal de Hansen, mas a literatura e os resultados do presente trabalho sugerem que é uma hipótese válida supor que um ou mais SNPs que levem a uma determinada variante enzimática menos eficiente, por ter uma menor afinidade aos substratos em que deveria atuar, possa prejudicar o funcionamento correto do sistema imune e aumentar a susceptibilidade à hanseníase.

## 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho ampliou o tamanho da amostra de GOMES (2007) e foi achada diferença estatisticamente significativa entre doentes e controles quanto à distribuição genotípica do SNP rs1799807 ( $p = 0,0053$ ; teste unicaudal de Fisher) e também quanto às frequências alélicas ( $\chi^2_{\text{corrigido}(1)} = 5,900$ ;  $p = 0,0151$ ), mostrando as seguintes frequências: em 165 pacientes  $7,88 \pm 2,10\%$  foram heterozigotos *70DG*, com frequência alélica de  $3,94 \pm 1,01\%$  de *70G*; Em 150 controles,  $1,33 \pm 0,94\%$  foram heterozigotos, com frequência alélica de  $0,67 \pm 0,57\%$ .

Não houve diferenças estatisticamente significativas na frequência de heterozigotos atípicos e do alelo atípico entre os pacientes paucibacilares e os multibacilares ( $p = 1,000$ ; teste bicaudal de Fisher e  $\chi^2_{(1)} = 0,0001$ ;  $p > 99\%$ , respectivamente). O valor de *odds ratio* entre doentes e controles foi 6,33 com  $IC_{(95\%)}$  de 1,40 a 28,53, significando que o heterozigoto possui uma chance cerca de seis vezes maior de adquirir a hanseníase. A comparação da distribuição de genótipos do presente estudo com os de MIKAMI e cols. (2008) resultou em OR significativo de 2,29 ( $IC_{(95\%)}$  de 1,04 a 5,05), significando que a heterozigose aumenta cerca de duas vezes o risco de contração do mal de Hansen. É possível que o valor de OR real esteja entre os valores obtidos com a comparação dos controles do presente trabalho e aquele obtido pela comparação com os dados de MIKAMI e cols. (2008).

Portanto, o presente trabalho corrobora a relação entre a presença da variante *D70G* da BChE e a susceptibilidade ao Mal de Hansen. O fato de não terem sido encontradas diferenças quanto à frequência de *D70G* nas duas formas clínicas, sugere que a associação entre BChE e hanseníase não se refere ao desenvolvimento da doença, mas sim ao risco de contraí-la.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre doentes e controles nas frequências alélicas do SNP rs4387996 ( $\chi^2_{(1)} = 5,067$ ;  $p = 2,44\%$ ). Contudo, após aplicar a correção de Bonferroni, o resultado deixa de ser significativo ( $p = 14,64\%$ ). É possível que ainda assim, este SNP esteja relacionado a um fator de proteção à hanseníase, pois está no haplótipo [T; C; G; A; G; A], que mostrou diferença significativa entre os grupos, estando aumentado nos controles ( $\chi^2_{(1)} = 8,62$ ;  $p = 0,33\%$ ). Seu valor de OR é  $= 0,34$  ( $IC_{(95\%)}$  de 0,16 a 0,72), significando um risco cerca de 3 vezes menor em adquirir a doença. Neste haplótipo, as diferenças de variantes em relação ao haplótipo mais frequente estão nos SNPs rs4440084 (C) e rs4387996 (último A). Comparando-se doentes e controles tendo como critério apenas a presença respectiva de C e A destes dois SNPs, verifica-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $\chi^2_{(1)} = 8,93$ ;  $p = 0,28\%$ ), com OR de 0,49 ( $IC_{(95\%)}$  0,30 – 0,79), novamente indicando um efeito protetor contra o mal de Hansen cerca de 2 vezes maior que os demais haplótipos.

Não houve diferença estatisticamente significativa de frequência alélica e genotípica entre nenhum dos grupos amostrais para os demais SNPs estudados, embora, para alguns dos SNPs, os valores da análise de associação estejam próximos do limite de significância. Em relação às comparações de frequência de haplótipos entre controles e pacientes, algumas foram significativas apenas antes da correção de Bonferroni: [T;G;G;A;G;A] com frequência aumentada em doentes ( $p = 2,16\%$ ) e [C;C;G;A;G;G] com frequência aumentada em controles ( $p = 0,97\%$ ).

A relação encontrada no presente estudo entre hanseníase e a variante atípica (70G) do gene *BCHE* da butirilcolinesterase, não está clara quanto a ser funcional ou dependente de desequilíbrio de ligação com variante de outro gene associado com a predisposição e o desenvolvimento do mal de Hansen. Entretanto, dados da literatura e do presente trabalho sugerem que é uma hipótese válida supor que um ou mais SNPs que levem a uma determinada variante enzimática menos eficiente, por ter uma menor afinidade a substratos em que deveria atuar, possa prejudicar o funcionamento correto do sistema imune mediado pela acetilcolina e aumentar a susceptibilidade à hanseníase.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L.; DEMENAIIS, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 42, p.256-266, 1988.

ABEL, L.; SANCHEZ, F.O.; OBERTI, J.; THUC, N.V.; HOA, L.V.; LAP, V.D.; SKAMENE, E.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 133-145, 1998.

AGARWAL, D.P.; GOEDDE, H.W.; SCHLOOT, W. A note on atypical serum cholinesterase and genetic factors in leprosy. **Hum. Hered.**, v. 23, p. 370-373, 1973.

ALCAÏS, A.; SANCHEZ, F.O.; THUC, N.V.; LAP, V.D.; OBERTI, J.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E.; ABEL, L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 302-308, 2000.

ALCAÏS, A.; MIRA, M. ; CASANOVA, J-L.; SCHURR, E.; ABEL, L. Gentic dissection of immunity in leprosy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17, p. 44-48, 2005.

ALLES, G.A.; HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. **J. Biol. Chem.**, v. 133, p. 375-390, 1940.

ALMEIDA, P.S.R.; SADDI, V.A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 4, p.382-386, 2007.

ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochem.**, v. 29, p. 124-131, 1990.

ARUGA, J.; MIKOSHIBA, K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal Transmembrane protein family controlling neurite outgrowth **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 24, p. 117–129, 2003.

BARRET, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. n. 21, p. 263 – 265, 2005

BARTELS, C.F.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LA DU, B.N. Two polymorphisms in the non coding regions of the *BCHE* gene. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.

BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1104-1114, 1992a.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 50, p. 1086-1103, 1992b.

BEIGUELMAN, B. Genetics and leprosy. **Ciênc. saúde coletiva.**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 117-128, 2002.

BENNETT, J.C.; PLUM, F. **Tratado de medicina interna**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.

BOECK, A.T.; FRY, D.L.; SASTRE, A.; LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, p. 154-156, 2002.

BOURNE, J.C.; COLLIER, H.O.J.; SOMERS, G.F. Succinylcholine (succinoyl-choline) muscle-relaxant of short action. **Lancet**, v. 1, p. 1225-1229, 1952.

BOTGARD disponível em:  
<<http://www.botgard.ucla.edu/html/botanytextbooks/economicbotany/Curare/>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2007.

BOVET, D. The relationships between isosterism and competitive phenomena in the field of drug therapy of the autonomic nervous system and that of the neuromuscular transmission, 1957. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964. The Official Web Site of The Nobel Foundation: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1957/bovet-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1957/bovet-lecture.html)

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A. M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by right-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Berlim, v. 48, p. 137-144, 1991.

BULAKH, P.M.; KOWALE, C.N.; RANADE, S.M.; DESHPANDE, V.A. Serum enzyme profile in tuberculoid leprosy. **Lepr India**. v. 54, n. 1, p. 69-74, 1982

BULAKH, P.M.; RANADE, S.M.; CHANDORKAR, A.G.; MULEY, P.R. Correlation between serum choline esterase and serum albumin in leprosy. **Indian J. Lepr.**, v. 57, p. 524–528, 1985.

CHAKRAVARTTI, M.R.; VOGEL, F. **A twin study on leprosy**, Stuttgart: Georg Thieme, 1973.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; LOURENÇO, M.A.C.; CULPI, L. Frequencies of atypical serum cholinesterase among Caucasians and Negroes from Southern Brazil. **Human Heredity**, Basel, v. 34, p. 388-392, 1984.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SOUZA, R.L.R. **Butyrylcholinesterase - a still mysterious enzyme**. In: Fifty Years of Human Genetics - A festschrift and liber amicorum to celebrate the life and work of George Robert Fraser. Wakefield Press, Adelaide, 2007.

De La VEGA, F.M.; ISAAC, H.; SCAFE, C.R. **A tool for selecting SNPs for association based on observed linkage disequilibrium patterns**. Pacific Symposium on Biocomputing, v. 11, p. 487 – 498, 2006.

De MESSIAS, I.J.; SANTAMARIA, J.; BRENDEN, M.; REIS, A.; MAUFF, G. Association of C4B deficiency (C4B\*Q0) with erythema nodosum in leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 92, p. 284–287, 1993.

DEY, D. C.; KANNO, T.; SUDO, K.; MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity – three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 2307, 1997. Suplemento.

DEY, D.C.; MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 5, p. 302-310, 1998.

DUYSEN, E.G.; LI, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. **Toxicology**, v. 233, p. 60 – 69, 2007

ELUI, V.M.C.; OLIVEIRA, M.H.P. de; SANTOS, C.B. dos. Órteses: um importante recurso no tratamento da mão em garra móvel de hansenianos. **Hansen. Int.**, Bauru, v.26, n.2, p. 105-111, 2001.



EMEDICINE disponível em <<http://emedicine.medscape.com/article/1104977-followup>>  
Acesso em 28/12/08.

EVANS, F.T.; GRAY, P.W.S.; LEHMANN, H.; SILK, E. Sensitivity to succinylcholine in relation to serum-cholinesterase. **Lancet**, v. 1, p. 1229-1230, 1952.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1, p. 47-50, 2005.

FEITOSA, M.F.; BORECKI, I.; KRIEGER, H.; BEIGUELMAN, B.; RAO, D.C. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 56, p.1179-1185, 1995.

FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A.V.S. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes and Immunity**, v. 3, p. 441-453, 2002.

FOSS, N.T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 335 - 339, 1997.

FORBAT, A.; LEHMANN, H.; SILK, E. Prolonged apnoea following injection of succinylcholine. **Lancet**, v. 2, p. 1067-1068, 1953.

FURTADO-ALLE, L.; ANDRADE, F.A.; NUNES, K.; MIKAMI, L.R.; SOUZA R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the -116A variant of the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase to lower means of enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p.115-118, 2008.

GÄTKE, MR.; OSTERGAARD, J.R.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F.; VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiol.**, v. 95, n. 3, p. 600-606, 2001.

GÄTKE, MR.; BUNDGAARD, J.R.; VIBY-MOGENSEN, J. Two novel mutations in the *BCHE* gene in patients with prolonged duration of action of mivacurium or succinylcholine during anesthesia. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 17, n. 11, p. 995-999, 2007.

GNATT, A.; PRODY, C.A.; ZAMIR R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA

transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. **Cancer Research**, v. 50, p. 1983-1987, 1990.

GOMES, H.J.P. **Investigação da relação entre a variante atípica da butirilcolinesterase e a susceptibilidade à hanseníase**. Curitiba, 2007. 44f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GOMES, H.J.P.; MIRA, M.T.; PREVEDELLO, F.C.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Investigação da relação entre a variante atípica da butirilcolinesterase e a susceptibilidade à hanseníase**. IX Encontro Paranaense de Genética, Curitiba, PR. CD: Resumos, página 79, 2008.

GREENBERG, C.P.; PRIMO-PARMO, S.L.; PANTUCK, E.J.; LA DU, B.N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v. 81, p. 419-421, 1995.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cyrrhosis. **Intern. Med.**, Tokyo v. 31, p. 357-362, 1992.

HERZ, F.; KAPLAN, E. A review: Human erythrocyte acetylcholinesterase. **Pediat. Res.** v. 7, p. 204-214, 1973.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S. L.; LA DU, B. N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Japan. J. Clin. Pathol.**, v. 40, p. 535-540, 1992.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; TOMITA, M.; WATANABE, Y.; MINATOGAWA, Y.; IWASAKI, K.; GOTOH, K.; SHIMIZU, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Ann. Hum. Genet.**, v. 61, p. 491-496, 1997a.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; UEDA, N.; HUKANO, K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta**, v. 261, p. 27-34, 1997b.

HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y.; IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. **Clin. Chim. Acta**, v. 303, p. 61-67, 2001.

IBGE disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Indicadores\\_Sociais/Sintese\\_de\\_Indicadores\\_Sociais\\_2007/Tabelas](ftp://ftp.ibge.gov.br/Indicadores_Sociais/Sintese_de_Indicadores_Sociais_2007/Tabelas) Acesso em 11 de novembro de 2007. < >

ISCID disponível em: <<http://www.iscid.org/encyclopedia/Xenobiotics>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2007.

JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, London v. 2, p. 234-240, 1992.

KALOW, W. Familial incidence of low pseudo-cholinesterase level. **Lancet**, v. 2, p. 576-577, 1956.

KALOW, W.; GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 339-346, 1957.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, Ottawa, v. 35, p. 1305-1320, 1957.

KANG, T.J.; CHAE, G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 31, p. 53-58, 2001.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

KUTTY, K. M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.13, p.239-243, 1980.

LEVANO, S.; GINZ, H.; SIEGEMUND, M.; MIODRAG, F.; VORONKOV, E.; URWYLER, A.; GIRARD, T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. **Anesthesiology**, v. 102, p. 531-535, 2005.

LIU, W.; CHENG, L.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H.; HADA, T. Novel mutation and multiple mutation found in human butyrylcholinesterase gene. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 326, p.193-199, 2002.

LU, W.D.; HADA, T.; FUKUI, K.; IMANISHI, H.; MATSUOKA, N.; IWASAKI, A.; HIGASHINO, K. Familial hypocholinesterasemia found in a family and a new confirmed mutation. **Intern. Med.**, v. 36, p. 9-13, 1997.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 235, p.41-57, 1995.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutation of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin. Chem.**, New York, v. 43, p. 924-929, 1997.

MAEKAWA, M.; TANIGUCHI, T.; ISHIKAWA, J.; TOYODA, S.; TAKAHATA, N. Problem with detection of an insertion-type mutation in the *BCHE* gene in a patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Clin.Chem.**, v. 50, p. 2410-2411, 2004.

MAGALHÃES, H.M. de; DUERKSEN, F. Resultados da técnica cirúrgica de transferência do músculo fibular longo para dorsiflexão do pé equino móvel em hanseníase. **Hansen. Int.**, Bauru, v.26, n.2, p. 99-104, 2001.

MAHMOUD, F.; HAINES, D.; ABUL, H.; OMU, A. Butyrylcholinesterase activity and pregnancy-associated differences in immunologically relevant peripheral blood leukocyte populations. **Am J Reprod Immunol.**, v. 50, p. 77-82 , 2003.

MANOHARAN, I.; WIESELER, S.; LAYER, P.G.; LOCKRIDGE, O.; BOOPATHY, R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 7, p. 461-468, 2006

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R.D.; MELO, G.E.B.A.DE; ANTUNES, C.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunologia da Hanseníase. **An Bras Dermatol.**,v. 83, n. 4, p. 343-350, 2008

McGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, A.H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 953-957, 1989.

MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase.** Curitiba, 2005. 181f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MIKAMI, L.R.; WIESELER, S.; SOUZA, R.L.; SCHOPFER, L.M.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, p. 213-218, 2008.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F.; A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 1215, 1988.

MILLER, E. N.; JAMIESON, S. E.; JOBERTY, C.; FAKIOLA, M.; HUDSON, D.; PEACOCK, C. S.; CORDELL, H. J.; SHAW, M.A.; LINS-LAINSON, Z.; SHAW, J. J.; RAMOS, F.; SILVEIRA, F.; BLACKWELL, J. M. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes Immun**, v. 5, p. 63- 67, 2004.

MIRA, M.T.; ALCAÏS, A.; VAN THUC, N.; THAI, V.H.; HUONG, N.T.; BA, N.N.; VERNER, A.; HUDSON, T.J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nat. Genet.**, v. 33, p. 412-415, 2003.

MIRA, M.T.; ALCAÏS, A.; NGUYEN, V.T.; MORAES, M.O.; DI FLUMERI, C.; VU, H.T.; MAI, C.P.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, N.B.; PHAM, X.K.; SARNO, E.N.; ALTER, A.; MONTPETIT, A.; MORAES, M.E.; MORAES, J.R.; DORE, C.; GALLANT, C.J.; LEPAGE, P.; VERNER, A.; VAN DE VOSSE, E.; HUDSON, T.J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, p. 636-640, 2004.

MIRA, M.T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1124-1131, 2006.

MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington v. 88, p. 11315-11319, 1991.

NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, M.C.; GRASER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAUS, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT → GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 46, p. 934-342, 1990.

NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; McGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 51, p. 821-828, 1992.

NUNES, K. **Haplótipos do gene *BCHE* da butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos.** Curitiba, 2007. 136f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA, L.C. **Investigação de associação das variantes do nucleotídeo –116 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase em diabete melito tipo 1.** Curitiba, 2006. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ON-KEI CHAN, A.; LAM, C.W.; TONG, S.F.; MAN TUNG, C.; YUNG, K.; CHAN, Y. W.; AU, K.M.; YUEN, Y.P.; HUNG, C.T.; NG, K.P.; SHEK, C.C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. **Clin. Chim. Acta**, v. 351, p. 155-159, 2005.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detections of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 96, p. 2766 – 2770, 1989.

PARMO-FOLLONI, F.; NUNES, K.; LEPIENSKI, L.M.; MIKAMI, L.; SOUZA, R.R.L.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Two new mutations of the human *BCHE* gene (*IVS3-14T>C* and *L574fsX576*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 135-137, 2008.

PREVEDELLO, F.; MIRA, M. T. Hanseníase, uma doença genética? **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 5, p. 451-459, 2007.

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSAMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 58, p. 52-64, 1996.

PRIMO-PARMO, S.L.; LIGHSTONE, H.; LA DU, B.N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, London, v. 7, p. 27-34, 1997.

RAJALINGAM, R.; SINGAL, D.P.; MEHRA, N.K. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 168–172, 1997.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 34, p. 255-273, 1966.

ROY, S.; FRODSHAM, A.; SAHA, B.; HAZRA, S.K.; MASCIE-TAYLOR, C.G.; HILL, A.V. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis**, v.179, p.187-191, 1999.

SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUGISAWA, T.; MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 274, p. 159-166, 1998.

SAÚDE disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/Hanseníase/index.html>>. Acesso em 16/02/07.

SERVICEXS disponível em :  
<<http://www.servicexs.com/servicexs+is+powered+by/applied+biosystems/snp+genotyping+assays/taqman+snp+assay/>> Acesso em 23/01/2010.

SHAW, M.A.; DONALDSON, I.J.; COLLINS, A. PEACOCK, C.S.; LINS-LAINSON, Z.; SHAW, J.J.; RAMOS, F.; SILVEIRA, S.; BLACKWELL, J.M. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun.**, v. 2, p. 196-204, 2001.

SIDDIQUI, M.R.; MEISNER, S.; TOSH, K.; BALAKRISHNAN, K.; GHEI, S.; FISHER, S.E.; GOLDING, M.; SHANKER NARAYAN, N.P.; SITARAMAN, T.; SENGUPTA, U.; PITCHAPPAN, R.; HILL, A.V. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 439-441, 2001.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, 1997.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA, L.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in the Brazilian population of European and African origin. **Hum. Biol.**, v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 84, p. 349-353, 2005.

STATISTICA for Windows [Computer program manual StatSoft, Inc..]. Tulsa, OK: WEB: <http://www.statsoft.com>, 2000.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; KANNO, T. Three different point mutation in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 29, n. 2, p. 165-169, 1996.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H.; TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 240, p. 372-375, 1997.

SUNEETHA, L.M.; BAHUMATHY, C.D.; SOLOMON, S.S.; SUNEETHA S.; KORULA R.J.; BALASUBRAMANIAN, A.S. Cholinesterase in leprosy nerves: A preliminary report. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 70, p. 208-210, 2002.

SUNEETHA, L.M., KARUNAKAR, V.; MEHERVANI; KAURNA; REDDY, R.G, SUNEETHA, S. Serum butyrylcholinesterase activity in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 72, p. 324-326, 2004.

TAKAGI, H.; NARAHARA, A.; TAKAYAMA, H.; SHIMODA, R.; NAGAMINE, T.; MORI, M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. **Int. Hepat. Comm.**, v. 6, p. 288-293, 1997.

THOMAS, M.; JOB, C. K. Serum atypical pseudocholinesterase and genetic factors in leprosy. **Brit. med. J.**, v. 3, p. 390-391, 1972.

THOMAS, M.; JOB, C.K.; KURIAN, P.V. Susceptibility to leprosy and serum atypical pseudocholinesterase. **Int. J. Lep.**, v. 44, n. 3, p. 315-318, 1976.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**. v. 420, p. 853-857, 2002.

TRACEY, K.J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway **J. Clin. Invest.** v. 117, n. 2, p. 289-296, 2007.

VISENTAINER, J.E.; TSUNETO, L.T.; SERRA, M. F.; PEIXOTO, P.R.; PETZL-ERLER, M. L. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. **Bras J Med Biol Res.** v. 30, n. 1, p. 51-59, 1997.



WHITTAKER, M.; LOWE, R.F.; ELLIS, B.P.B. Serum cholinesterase variants in African leprosy patients resident in Rhodesia. **Hum. Hered.**, v. 26, p.372-379, 1976.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, London, v. 35, p.174-197, 1980.

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. New York: Karger, 1986.

WHO. **A guide to leprosy control**. Geneva, 1980.

WHO. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Geneva, Technical Report Series, n. 675, 1982.

WHO (2005) disponível em <<http://www.who.int/lep/situation/BurdenEnd2005.pdf>>. Acesso em 16/08/07.

WHO. Global leprosy situation. **Wkly. Epidemiol. Rec.** v.84, n. 33., p.333-340, 2009.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann. Hum. Genet.**, v. 19, p. 251-253, 1955.

YEN, T.; NIGHTINGALE, B.N.; BURNS, J.C.; SULLIVAN, D.R.; STEWART, P.M. Butyrylcholinesterase (BChE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1297-1308, 2003.